

PAULO FERNANDO MARQUES DUARTE FILHO

**ESTUDOS SOBRE O CRESCIMENTO E A VIABILIDADE DE
FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS EM CULTIVO SUBMERSO**

Florianópolis - SC
Junho/2009

PAULO FERNANDO MARQUES DUARTE FILHO

**ESTUDOS SOBRE O CRESCIMENTO E A VIABILIDADE DE
FUNGOS ECTOMICORRÍZICOS EM CULTIVO SUBMERSO**

Tese apresentada ao Departamento de
Engenharia Química e Engenharia de
Alimentos da Universidade Federal de
Santa Catarina como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de
Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.

Co-orientadores: Prof^a. Dra. Vetúria Lopes Oliveira

Prof. Dr. Márcio José Rossi

Florianópolis – SC

Junho/2009

**Catlogação na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina**

D812 Duarte Filho, Paulo Fernando Marques
 Estudos sobre o crescimento e a viabilidade de fungos
 ectomicorrízicos em cultivo submerso [tese] / Paulo
 Fernando Marques Duarte Filho ; orientador, Agenor
 Furigo Jr.. - Florianópolis, SC, 2009.
 138 f.: il., tabs., grafs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Química.

Inclui bibliografia

1. Engenharia química. 2. Fungos ectomicorrízicos.
3. Bioreatores. 4. Metabólitos secundários. 5. Carvão
ativo. 6. Viabilidade fúngica. I. Furigo Junior, Agenor.
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDU 66.0

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Paulo Fernando Duarte e especialmente Maria Grudzinski Duarte (*in memoriam*) pelo carinho e incentivo em toda minha vida,

A minha esposa Renata pela dedicação, carinho e contribuição no trabalho,

Aos colegas de laboratório, Bianca, Gisela, Carla, Pedro, Luiz, Rodrigo, Luciano, Hugo pela amizade e colaboração,

Ao Everton pela disponibilidade e colaboração no trabalho,

Aos Professores e funcionários do MIP, em especial o Professor Artur Smânia pela utilização de seu laboratório nas análises de difusão e purificação dos compostos,

Ao Professor Moacir Pizzolatti e seu orientando Heros pelas análises de infravermelho e CCD,

Ao Professor Carlos H. Soares pelas análises e contribuições no trabalho,

A Professora Vetúria pelo carinho, amizade e contribuições que foram determinantes para execução desse trabalho,

Ao Professor e amigo Márcio pela convivência, amizade e valorosas contribuições na revisão e montagem de experimentos,

Ao Professor Agenor pela amizade, orientação e contribuição no trabalho,

Aos meus amigos Franciello, Júlio e Gustavo pelo carinho e amizade construído ao longo da execução desse trabalho,

A todos os meus familiares que sempre me apoiaram nos momentos em que mais precisei,

Aos meus colegas e amigos, Oscar, Paulo, Marco Aurélio, Cristina, Denise, Costa, Alexandre, Dilon, Cristina Santos, Daiana, Norton, Maurício, Rodrigo, Marcelo, Melissa, Lucas, Camila, Klaus e Zezo que sempre me apoiaram,

A Capes pelo apoio financeiro de parte desse trabalho,

Ao CNPq pelos recursos que ajudaram a viabilizar a instrumentalização do biorreator,

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina,

Aos membros da banca examinadora,

A todos que de certa forma contribuíram para realização desse trabalho,

Muito Obrigado!

Índice

ÍNDICE DE QUADROS
ÍNDICE DE FIGURAS
LISTA DE SÍMBOLOS
LISTA DE ABREVIATURAS
RESUMO
ABSTRACT
1. Introdução.....	1
2. Objetivo Geral	3
2.1. Objetivos Específicos	3
3. Revisão da Literatura	4
3.1. O setor florestal brasileiro	4
3.2. Micorrizas.....	6
3.3. Metabolismo de carbono e nitrogênio em fungos ectomi- corrízicos.....	8
3.4. Produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos.....	10
3.5. Biorreator airlift	13
3.6. Metabólitos secundários de fungos ectomicorrízicos	14
3.7. Identificação de metabólitos secundários de microrganismos	16
4. Material e Métodos.....	21
4.1. Descrição dos isolados fúngicos ectomicorrízicos	21
4.2 Meios de cultura.....	22
4.3. Preparo do inóculo e inoculação.....	23
4.4. Condições de cultivo	23
4.5. Biorreator airlift	24
4.6. Procedimentos de desinfecção e esterilização.....	25

4.7. Determinações analíticas.....	25
4.7.1. Obtenção das amostras.....	25
4.7.2. Determinação da biomassa seca.....	26
4.7.3. Determinação de glicose	26
4.7.4. Determinação de compostos fenólicos totais	26
4.7.5. Dosagem de cor.....	27
4.8. Obtenção das grandezas cinéticas e estequiométricas.....	27
4.8.1. Velocidade específica de crescimento	28
4.8.2. Fator de conversão de substrato a células	30
4.8.3. Produtividade em biomassa	31
4.9. Procedimentos Experimentais	31
4.9.1. Monitoramento da viabilidade de fungos ectomicorrízicos	31
4.9.1.1. Influência do carvão ativo na manutenção da	
viabilidade de fungos ectomicorrízicos	32
4.9.1.2. Influência de processos oxidativos na manutenção da	
viabilidade de fungos ectomicorrízicos	33
4.9.2. Manutenção do pH do meio de cultura: influência na	
produção de biomassa de fungos ectomicorrízicos em meio líquido	
.....	34
4.9.3. Influência do carvão ativo no crescimento de fungos	
ectomicorrízicos em meio líquido.....	36
4.9.4. Detecção de metabólitos tóxicos extracelulares e a	
influência do carvão ativo na adsorção desses compostos.....	36
4.9.4.1. Produção de metabólitos inibidores não voláteis	36
4.9.4.2. Efeito de filtrado de cultura de fungo ectomicorrízico	
no crescimento do fungo produtor e de fungo fitopatogênico	38
4.9.4.3. Testes de antagonismo de fungos ectomicorrízicos em	
relação a fitopatógeno em meio sólido.....	39
4.9.4.4. Atividade antifúngica e antibacteriana dos metabólitos	
extra-celulares	40
4.9.5. Caracterização dos metabólitos tóxicos extracelulares e	
intracelulares.....	41
4.9.5.1. Separação e identificação	41
4.9.5.2. Testes de inibição contra fungo ectomicorrízico	
utilizando-se metabólitos intracelulares do próprio fungo	43
4.9.5.3. Testes de inibição dos metabólitos intracelulares de	
fungos ecto-micorrízicos contra fungo fitopatogênico e	
bactérias patogênicas do ho-mem.....	44

4.9.6. Acompanhamento da viabilidade de fungos ectomicorrízicos e investigação dos metabólitos intracelulares através de cromatografia de camada delgada (CCD)	45
4.9.7. Instrumentalização do biorreator airlift.....	46
4.9.7.1. Estudo cinético do crescimento do fECM <i>Rhizopogon nigrescens</i> (UFSC-Rh90) durante cultivo controlado em biorreator airlift.....	48
5. Resultados e Discussão.....	51
5.1. Monitoramento da viabilidade	51
5.1.1. Influência do carvão ativo na manutenção da viabilidade de fungos ectomicorrízicos	51
5.1.2. Influência da adição de ácido ascórbico na manutenção da viabilidade de fungos ectomicorrízicos	53
5.1.3. Influência da presença de oxigênio na manutenção da viabilidade de fungos ectomicorrízicos	56
5.2. Manutenção do pH do meio de cultura: influência na produção de biomassa de fungos ectomicorrízicos em meio líquido	57
5.3. Influência do carvão ativo no crescimento de fungos ectomicorrízicos em meio líquido.....	63
5.4. Detecção de metabólitos tóxicos extracelulares e a influência do carvão ativo na adsorção desses compostos.....	65
5.4.1. Produção de metabólitos inibidores não voláteis	65
5.4.2. Efeito de filtrado de cultura de fungo ectomicorrízico no crescimento do fungo produtor e de fungo fitopatogênico	67
5.4.3. Testes de antagonismo de fungos ectomicorrízicos em relação a fitopatógeno em meio sólido.....	70
5.4.4. Atividade antifúngica e antibacteriana dos metabólitos extra-celulares de fungos ectomicorrízicos	72
5.5. Caracterização dos metabólitos tóxicos extracelulares e intrace-lulares de fungos ectomicorrízicos	74
5.5.1. Separação e identificação	74
5.5.2. Testes de inibição contra fungo ectomicorrízico utilizando-se metabólitos intracelulares do próprio fungo	80
5.5.3. Testes de inibição de extratos de fungos ectomicorrízicos con-tra fungo fitopatogênico e bactérias patogênicas ao homem.	84

5.6. Acompanhamento da viabilidade de fungos ectomicorrízicos e investigação dos metabólitos intracelulares através de cromatografia de camada delgada (CCD).....	87
5.7. Instrumentalização do biorreator airlift	88
5.7.1 Estudo cinético do crescimento de fungo ectomicorrízico durante cultivo controlado em biorreator airlift	91
6. Considerações finais.....	99
7. Referências Bibliográficas.....	101
Anexos	112

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Composição dos meios de cultura utilizados para os estudos com isolados de fungos ectomicorrízicos	22
Quadro 2. Matriz do planejamento fatorial estrela com os níveis reais das variáveis e os níveis codificados.....	35
Quadro 3. Bandas significativas no espectro de Infravermelho do filtrado e do micélio dos isolados UFSC-Rh90 (<i>Rhizopogon nigrescens</i>) e UFSC-Pt188 (<i>Pisolithus microcarpus</i>).....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado da conversão de carboidratos por fungos ectomicorrízicos (MARTIN <i>et al.</i> , 1987).	9
Figura 2. Detalhes de inoculantes de fungos ectomicorrízicos: (a) micélio em turfa/vermiculita; (b) micélio encapsulado em alginato de cálcio. Viabilidade de inoculantes em meio sólido: (c) inoculante turfa/vermiculita; (d) inoculante em alginato de cálcio (ROSSI, 2006).	11
Figura 3. Biorreator <i>airlift</i> utilizado nos ensaios experimentais e seus acessórios.	24
Figura 4. Esquema simplificado do experimento sobre a influência do carvão ativo na manutenção da viabilidade após fragmentação.....	32
Figura 5. Aparato experimental utilizado no ensaio sobre a influência do oxigênio na manutenção da viabilidade do fECM <i>Pisolithus microcarpus</i> (UFSC-Pt188).	34
Figura 6. Esquema simplificado para o ensaio sobre a produção de metabólitos inibidores não voláteis.....	37
Figura 7. Esquema simplificado do procedimento experimental para estudar o efeito do filtrado fúngico de fECM no crescimento do fungo produtor e de fungo fitopatógeno.....	39
Figura 8. Esquema do teste de difusão dos filtrados fúngicos liofilizados contra microrganismos patogênicos.....	41
Figura 9. Esquema das etapas de purificação e identificação dos metabólitos secundários intra e extracelulares de fungos ectomicorrízicos.....	42
Figura 10. Esquema do experimento de monitoramento da viabilidade de fungo ectomicorrízico e investigação dos metabólitos intracelulares por CCD.....	45
Figura 11. Panorama do Biorreator de Fermentação (BRF) (a) e da central de controle (b). (1) Fluxômetro de massa; (2) Sondas de OD e	

pH; (3) Bombas peristálticas; (4) Transmissores para OD e pH; (5) Cabeamento; (6) QC1; (7) Bloco conector NI SC2075..... 47

Figura 12. Diagrama de processo e instrumentalização do biorreator (diagrama P&I)..... 49

Figura 13. Viabilidade de uma suspensão miceliana do isolado UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*), inoculada imediatamente após a fragmentação, em meio de cultura PGKM sólido: (a) suspensão sem carvão ativo; (b) suspensão com carvão ativo..... 52

Figura 14. Viabilidade de uma suspensão do isolado UFSC-Pt188 (*Pisolithus microcarpus*) inoculada imediatamente após a fragmentação, em meio de cultura PGKM sólido: (a) suspensão com carvão ativo; (b) suspensão sem carvão ativo..... 52

Figura 15. Viabilidade inicial de suspensões micelianas do isolado UFSC-Pt116 (*Pisolithus microcarpus*), submetidas a diferentes tratamentos e inoculadas em meio de cultura PGKM sólido com carvão ativo. (a) suspensão tratada com 0,2 % de carvão; (b) suspensão tratada com 120 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico; (c) suspensão miceliana sem aditivos. 54

Figura 16. Viabilidade, após 48 horas da fragmentação, de suspensões micelianas do isolado UFSC-Pt116 (*Pisolithus microcarpus*), submetidas a diferentes tratamentos e inoculadas em meio de cultura PGKM sólido com carvão: (a) suspensão tratada com 0,2 % de carvão; (b) suspensão tratada com 120 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico; (c) suspensão miceliana sem aditivos. 55

Figura 17. Viabilidade, 7 dias após a fragmentação, de suspensões micelianas do isolado UFSC-Pt116 (*Pisolithus microcarpus*), submetidas a diferentes tratamentos e inoculadas em meio de cultura PGKM sólido com carvão ativos: (a) suspensão tratada com 0,2 % de carvão; (b) suspensão tratada com 120 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico; (c) suspensão miceliana sem aditivos. 55

Figura 18. Influência da adição de ácido ascórbico na coloração de suspensões micelianas do isolado UFSC-Pt116 (*Pisolithus microcarpus*),

logo após a fragmentação: (a) em ausência de ácido ascórbico; (b) em presença de carvão ativo; (c) com ácido ascórbico. 56

Figura 19. Coloração das suspensões micelianas do isolado UFSC-Pt188: (a) sem tratamento com nitrogênio; (b) com tratamento. 57

Figura 20. Variação em módulo de pH e concentração de biomassa ao final de 15 dias de cultivo em frascos estáticos do isolado UFSC-Sc42 (*Scleroderma* sp). 58

Figura 21. Variação em módulo de pH e da concentração de biomassa ao final de 24 dias de cultivo em frascos estáticos do isolado UFSC-Pt188 (*Pisolithus microcarpus*). 59

Figura 22 Correlação da variação de pH em módulo com a biomassa para os isolados fúngicos UFSC-Sc42 (a) e UFSC Pt188 (b). 59

Figura 23. Gráfico de Pareto para os efeitos estimados na resposta biomassa para os isolados de fungos ectomicorrízicos: (a) UFSC-Sc42; (b) UFSC-Pt188. 60

Figura 24. Gráfico de Pareto para os efeitos estimados na resposta variação de pH para os isolados de fungos ectomicorrízicos: (a) UFSC-Sc42; (b) UFSC-Pt188. 61

Figura 25. Produção de biomassa e variação de pH durante o cultivo em biorreator *airlift* de *Scleroderma* sp. (UFSC-Sc42), em meio de cultura PGKM. 62

Figura 26. Valores médios de biomassa, pH e $Y_{X/S}$ obtidos ao final de 22 dias de cultivo em meio líquido PGKM com e sem carvão ativo dos isolados de fECM UFSC-Rh90, UFSC-Sc42, UFSC-Pt188 e UFSC-Pt116. 64

Figura 27. Gráfico das médias para a interação entre isolado, meio de cultura e etapa do cultivo. 65

Figura 28. Aspecto e tamanho da colônia dos isolados (a) UFSC-Rh90 e (b) UFSC-Sc42, aos 15 dias em meio de cultura sólido sem carvão ativo, sobre papel celofane. 66

Figura 29. Crescimento do fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt188) em meio sólido contendo filtrado fúngico nas concentrações de 0, 5, 10 e 15 %: (a) com carvão ativo e (b) sem carvão ativo. 68

Figura 30. Crescimento do fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum* em meio sólido contendo (a) 0% e (b) 15% de filtrado do fECM *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt188), sem carvão ativo..... 69

Figura 31. Antagonismo do fungo ectomicorrízico *Rhizopogon nigrescens* (UFSC-Rh90) em (a) meio sem carvão ativo e (b) com carvão ativo em relação ao fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Observe-se a intensa pigmentação marrom, produzida pelo isolado UFSC-Rh90, no meio sem carvão..... 71

Figura 32. Antagonismo do fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt188) em (a) meio com carvão ativo e (b) meio sem carvão ativo, em relação ao fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Observe-se a intensa pigmentação marrom, produzida pelo isolado UFSC-Pt188, no meio sem carvão. 71

Figura 33. Teste de difusão dos filtrados de cultura dos isolados fúngicos ectomicorrízicos, UFSC-Rh90 e UFSC-Sc42, utilizando como indicadores os microrganismos: (a) *Bacillus cereus* (ATCC 11778); (b) *Candida albicans* (ATCC14053); (c) *Staphylococcus aureus* (ATCC25923); (d) *Escherichia coli* (ATCC25922)..... 73

Figura 34. Análise qualitativa por CCD no filtrado e no micélio obtidos por cultivo estático em meio líquido. 188 (F): Filtrado do isolado UFSC-Pt188; 188 (M) micélio do isolado UFSC-Pt188; 90 (F) filtrado do isolado UFSC-Rh90; 90 (M) micélio do isolado UFSC-Rh90. 75

Figura 35. Sobreposição dos cromatogramas do filtrado e do micélio para o isolado UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*), obtidos por cromatografia gasosa..... 76

Figura 36. Sobreposição dos cromatogramas do filtrado e do micélio para o isolado UFSC-Pt188 (<i>Pisolithus microcarpus</i>), obtidos por cromatografia gasosa.....	76
Figura 37. Espectro de infravermelho do filtrado do isolado UFSC-Rh90 (<i>Rhizopogon nigrescens</i>).....	77
Figura 38. Espectro de infravermelho do extrato de micélio do isolado UFSC-Rh90 (<i>Rhizopogon nigrescens</i>).....	78
Figura 39. Espectro de infravermelho do filtrado do isolado UFSC-Pt188 (<i>Pisolithus microcarpus</i>).	78
Figura 40. Espectro de infravermelho do extrato de micélio do isolado UFSC-Pt188 (<i>Pisolithus microcarpus</i>).	79
Figura 41. Teste de inibição com o fungo ectomicorrízico <i>Scleroderma</i> sp. (UFSC-Sc42) em meio sólido utilizando metabólitos intracelulares da fração aquosa obtida no processo de extração de metabólitos do próprio micélio fúngico. (a) meio com carvão ativo; (b) sem carvão ativo.81	
Figura 42. Tratamentos testemunha do teste de inibição utilizando o fungo <i>Scleroderma</i> sp. (UFSC-Sc42), sem a presença de metabólitos intracelulares: (a) meio com carvão; (b) meio sem carvão.	82
Figura 44. Aspecto das colônias do fungo ectomicorrízico <i>Scleroderma</i> sp. (UFSC-Sc42) em meio sólido com carvão ativo: (A) em presença de extrato de micélio da fração acetato de etila; e (B) sem extrato de micélio (testemunha).....	83
Figura 45. Aspecto das colônias do fungo ectomicorrízico <i>Scleroderma</i> sp. (UFSC-Sc42) em meio sólido sem carvão ativo: (A) em presença de extrato de micélio da fração acetato de etila e (B) sem extrato de micélio (testemunha).....	83
Figura 46. Teste de inibição com o fitopatógeno <i>Fusarium oxysporum</i> em meio sólido utilizando metabólitos intracelulares da fração aquosa obtida no processo de extração de metabólitos do micélio fúngico do <i>Scleroderma</i> sp. (UFSC-Sc42) (a) meio com carvão; (b) sem carvão. .	85

Figura 47. Tratamentos testemunha do teste de inibição utilizando o fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. (a) meio com carvão; (b) meio sem carvão. 86

Figura 48. Teste de difusão utilizando as frações aquosas resultantes das extrações líquido-líquido do filtrado do isolado *Scleroderma* sp. (UFSC-Sc42) (1) e dos metabólitos intracelulares (2) UFSC-Sc42. (a) *Escherichia coli* (ATCC25922); (b) *Bacillus cereus* (ATCC 11778); (c) *Staphylococcus aureus* (ATCC25923). (T) testemunha..... 87

Figura 49. Gráficos da interface gráfica do programa BRF.vi, mostrando o comportamento das entradas e saídas de sinal durante a fase intensa do metabolismo em cultivo de *Bacillus* sp. A linha vermelha da saída é a abertura mínima da válvula de ar (*prését*) e a linha preta mostra a variação da abertura da válvula na tentativa de estabilizar a concentração de OD. 90

Figura 50. Dados do cultivo controlado do isolado UFSC-Rh90 (*Rizopogon nigrescens*) em meio PGKM, mostrando os vários eventos ocorridos. Os pontos estão em intervalos de 1 hora. 92

Figura 51. Informações do cultivo do isolado UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*) entre a 33^a e a 52^a hora, onde se observam os dois momentos de falta de energia e suas consequências sobre a concentração de oxigênio dissolvido. 93

Figura 52. Informações do cultivo do isolado UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*), entre a 88^a e 104^a hora, mostrando o momento de erro (“Bug”) na execução do BRF.vi e suas consequências sobre a concentração de oxigênio dissolvido..... 94

Figura 53. Aspectos das amostras retiradas durante o cultivo do isolado UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*), mostrando a intensa pigmentação do meio de cultura a partir da amostra X4 (85^a hora de cultivo). 95

Figura 54. Produção de biomassa e consumo de glicose (a), e determinação da conversão de glicose em biomassa (b) para o cultivo do

isolado UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*) em biorreator *airlift*. ■
glicose; ♦ biomassa; ▲ absorbância (465 nm)..... 96

Figura 55. Determinação da velocidade específica média de crescimento
(a) e perfil da velocidade específica de crescimento (b), durante o
cultivo controlado do isolado UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*) em
biorreator *airlift*..... 97

Figura 56. Aspecto da biomassa obtida em dois diferentes cultivos do
isolado UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*) em biorreator *airlift*,
comparando a morfologia dos *pellets* obtidos neste trabalho (a), e no
trabalho de Rossi (2006) (b)..... 98

LISTA DE SÍMBOLOS

R_t : Tempo de retenção	-
μ_x : Velocidade específica de crescimento celular	dia ⁻¹
μ_s : Velocidade específica de consumo de substrato	$g_s \cdot g_x^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$
μ_p : Velocidade específica de formação de produto	$g_p \cdot g_x^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$
μ_{\max} : Velocidade específica máxima de crescimento	dia ⁻¹
X_{0i} : Concentração celular no instante de início da fase exponencial de crescimento	$g \cdot L^{-1}$
T_d : Tempo de duplicação da biomassa	dia
X_0 : Concentração celular inicial	$g \cdot L^{-1}$
X : Concentração celular no instante t	$g \cdot L^{-1}$
S_0 : Concentração inicial de substrato	$g \cdot L^{-1}$
S : Concentração residual de substrato no instante t	$g \cdot L^{-1}$
$Y_{X/S}$: Fator de conversão de substratos à células	$g_x \cdot g_s^{-1}$
m_s : Coeficiente de manutenção para o substrato	$g_s \cdot g_x^{-1} \cdot h^{-1}$
$Y'_{X/S}$: Fator de conversão “real” de substrato à células	$g_x \cdot g_s^{-1}$
P_x : Produtividade em biomassa	$g \cdot L^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$
X_m : Concentração máxima de biomassa	$g \cdot L^{-1}$
T_F : Tempo total de cultivo	dia
A_d : Área da seção transversal do <i>downcomer</i>	cm ²
A_r : Área da seção transversal do <i>riser</i>	cm ²
H : Altura	m
D : Diâmetro interno do <i>riser</i>	mm
X_1 : Nível codificado do volume de tampão citrato	-
X_2 : Nível codificado do volume de tampão succinato	-
S : Concentração de substrato (glicose)	$g \cdot L^{-1}$
X : Concentração de células	$g \cdot L^{-1}$
P : Concentração de produtos (metabólitos)	$g \cdot L^{-1}$
$Y_{P/S}$: Fator de conversão de substrato em produto	$g_p \cdot g_s^{-1}$
N : Deformação axial	-
Γ : Deformação angular	-

LISTA DE ABREVIATURAS

fECM	Fungo ectomicorrízico
GD	Glutamato desidrogenase
GS	Glutamina sintetase
GOS	Glutamato sintase
STR	Reator de tanque agitado
CCD	Cromatografia de camada delgada
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
CG	Cromatografia gasosa
UV	Ultravioleta
IV	Infravermelho
RMN	Ressonância magnética nuclear
MNM	Meio Melin-Norkrans modificado
PGKM	Meio Pridham-Gottlieb modificado
BOD	Incubadora para cultivos e ensaios de demanda bioquímica de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
vvm	Volume de ar por volume do biorreator por minuto
atm	atmosfera
DNS	ácido 3,5-dinitrosalicílico
4-AAP	4-aminoantipirina
DMSO	Dimetilsulfóxido
ATCC	American Type Culture Collection
PIB	Produto interno bruto
PID	Proporcional, integral e derivativo
OD	Oxigênio dissolvido
Tc	Tampão citrato de sódio
Ts	Tampão succinato de sódio

RESUMO

Para aumentar a produtividade das plantações de espécies de *Eucalyptus* e *Pinus*, sem aumentar a pressão sobre os remanescentes de florestas nativas ou a quantidade de insumos químicos, existem várias estratégias de caráter biotecnológico. Uma delas é a inoculação das plantas com fungos ectomicorrízicos (fECM). Esses fungos beneficiam as plantas pelo aumento da captação de água e nutrientes e proteção contra fatores adversos. Essa prática exige, no entanto, o desenvolvimento de tecnologias de produção de inoculantes fúngicos. Demonstrou-se que é possível cultivar esses fungos em biorreatores do tipo *airlift*, mas quando o micélio desses fungos é fragmentado, no início do processo de cultivo, ou na etapa final para veiculação do inoculante, ele perde grande parte de sua viabilidade. Nesse âmbito, este trabalho teve por principal objetivo identificar os metabólitos responsáveis por esse processo, através de técnicas de separação e análises cromatográficas, espectroscópicas e de infravermelho. Além disso, procurou-se investigar formas de atenuar esses efeitos e verificar a toxicidade desses metabólitos frente a outros microrganismos: *Fusarium oxysporum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Candida albicans*, através de testes em meio de cultura. Estudou-se se a manutenção do pH e a adição de carvão ativo influenciavam o crescimento desses fungos em meio líquido. Além disso, investigou-se o efeito da adição de ácido ascórbico e de oxigênio na viabilidade de suspensões Micelianas. Para esses estudos foram utilizados quatro isolados de fungos ectomicorrízicos: dois *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt116 e UFSC-Pt188), de eucalipto, um isolado de *Scleroderma* sp (UFSC-Sc42) e um de *Rhizopogon nigrescens* (UFSC-Rh90), ambos de pinus. Por último, equipou-se um biorreator *airlift* com um sistema de controle da vazão de ar, de pH e de oxigênio dissolvido, instalou-se um *software* gerenciador, e realizou-se um cultivo controlado do isolado UFSC-Rh90. Nestes estudos, observou-se que a incorporação de carvão ativo em meio líquido, em frascos estáticos, aumentou a produção de biomassa pelo isolado UFSC-Pt116, mas não pelos isolados UFSC-Pt188, UFSC-Rh90 e UFSC-Sc42. Porém, a adição de carvão ativo à suspensão miceliana do isolado UFSC-Pt116 manteve a viabilidade do micélio por até 7 dias após a fragmentação, ao passo que a suspensão com ácido ascórbico manteve-se viável somente 48 h. A retirada do oxigênio na suspensão de micélio fragmentado evitou a oxidação de lipídeos, mas não aumentou a viabilidade. Não houve efeito benéfico da manutenção do pH no crescimento dos fungos.

Para o isolado UFSC-Pt188 ficou claramente demonstrado que a maior produção de biomassa foi acompanhada pela maior variação de pH do meio. Os isolados UFSC-Rh90 e UFSC-Sc42 não formaram metabólitos inibidores não voláteis, quando cultivados em meio sólido. O filtrado de cultura do isolado UFSC-Pt188 não apresentou toxicidade ao fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, nem ao próprio fungo, nas diferentes concentrações testadas. Em confrontação direta, o isolado UFSC-Rh90 inibiu *Fusarium oxysporum*, tanto na presença quanto na ausência de carvão ativo. Já o isolado UFSC-Pt188 inibiu o fitopatógeno apenas na ausência de carvão. Os metabólitos extracelulares dos isolados UFSC-Rh90 e UFSC-Sc42 não apresentaram toxicidade contra os microrganismos testados (bactérias e *Candida albicans*). Porém, a fração aquosa resultante da extração dos metabólitos intracelulares do isolado UFSC-Sc42, embora não tenha apresentado toxicidade contra o próprio fungo nem contra o fitopatógeno, foi tóxica para *Staphylococcus aureus*. A fração de acetato de etila apresentou toxicidade contra o próprio fungo. As análises das frações intra e extracelulares, através da espectroscopia de infravermelho, revelaram bandas de absorção características de ácidos graxos, ésteres, fenóis e carboidratos. O cultivo controlado do isolado UFSC-Rh90, após instrumentalização do biorreator *airlift*, foi considerado eficiente, pois proporcionou alta produtividade e alta conversão. Os dados obtidos, analisados por um *software* específico, permitiram uma melhor compreensão do cultivo e representarão uma importante ferramenta para o desenvolvimento de técnicas de produção de inoculantes.

Palavras-Chave: Fungo ectomicorrízico, metabólitos secundários, biorreator *airlift*, carvão ativo, viabilidade fúngica

ABSTRACT

Studies on the growth and viability of ectomycorrhizal fungi in submerge cultivation

To increase the productivity of *Eucalyptus* and *Pinus* plantations, without increasing the pressure on the remnants of native forests or the amount of chemical inputs, there are several biotechnological strategies. One of them is the inoculation with ectomycorrhizal fungi. These fungi benefit the plants by increasing the uptake of water and nutrients and protecting them against adverse factors. This practice requires the development of technologies for inoculants production. It was demonstrated that it is possible to cultivate these fungi on airlift bioreactors. However, when the mycelium of these fungi is fragmented at the beginning of the cultivation or at the end of the inoculant process, it loses the viability. In this context, the main aim of this work was to identify the metabolites involved in this process by means of separation techniques and chromatographic and infrared analysis. Furthermore, it was investigated how to mitigate those effects and the toxicity of these metabolites towards other microorganisms: *Fusarium oxysporum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Candida albicans*, employing tests in culture medium. It was also studied the influence of the pH and activated charcoal on fungal growth in liquid medium and of the addition of ascorbic acid and oxygen on the viability of mycelium suspensions. For these studies four isolates of ectomycorrhizal fungi were tested: two of them were *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt116 and UFSC-Pt188) from eucalypt; one *Scleroderma* sp. (UFSC-Sc42) and one *Rhizopogon nigrescens* (UFSC-Rh90) isolate, both from pine. At the end of these studies, an airlift bioreactor was equipped with air flow, pH and dissolved oxygen control systems and it was set up a management software. Afterwards, an ectomycorrhizal isolate was cultivated under controlled conditions. The results of these studies show that incorporation of activated charcoal in liquid medium in static flasks, increased biomass production by isolate UFSC-Pt116, but not by isolates UFSC-Pt188, UFSC-Rh90 and UFSC-Sc42. However, the addition of activated charcoal to a mycelial suspension of the isolate UFSC-Pt116 helped to maintain mycelium viability up to 7 days after fragmentation, whereas the suspension with ascorbic acid remained viable only for 48 h. The removing of oxygen from mycelial suspension prevented lipid oxidation, but did not increase the viability. The isolates UFSC-Rh90

and UFSC-Sc42 did not form inhibitory non-volatile metabolites when grown on solid medium. The culture filtrate of the isolate UFSC-Pt188, when added to the cultures medium, was not toxic towards the fungus itself nor towards *Fusarium oxysporum*. However, when confronted in solid medium, the isolate UFSC-Rh90 inhibited *Fusarium oxysporum* both in presence and in absence of activated charcoal whereas the isolate UFSC-Pt188 inhibited the plant pathogen only on absence of activated charcoal. Extracellular metabolites of the isolates UFSC-Rh90 and UFSC-Sc42 were not toxic to the other microorganisms tested (bacteria and *Candida albicans*). The aqueous fraction from the intracellular metabolites of the isolate UFSC-Sc42 did not show toxicity against the fungus itself nor against the plant pathogen, but was toxic towards *Staphylococcus aureus*. The ethyl acetate fraction showed toxicity against the producer fungus. The analysis of intra and extracellular fractions through the infrared spectroscopy revealed absorption bands of fatty acids, esters, phenols and carbohydrates. Controlled cultivation of the isolate UFSC-Rh90 in the equipped airlift bioreactor was considered efficient because it provided high productivity and conversion. The analysis of data obtained by a specific software allowed a better understanding of the process and will be an important tool for development of inoculant production processes.

Keywords: ectomycorrhizal fungi, secondary metabolites, airlift bioreactor, activated charcoal, fungal viability

1. Introdução

No Brasil, existem cerca de 5 milhões de hectares de áreas re-florestadas com pínus e eucalipto. Essas plantas são as de maior importância no setor florestal do país sendo utilizadas na produção de celulose, móveis, carvão, metalurgia entre outros. Suas raízes encontram-se conectadas a uma extensa rede de filamentos fúngicos, formando uma associação simbiótica denominada ectomicorriza (FRANK, 1885).

Os fungos ectomicorrízicos (fECM) beneficiam as plantas pelo aumento da absorção de nutrientes e de água e pela maior tolerância às variações de pH e temperatura do solo. Além disso, servem de barreira a patógenos de raízes (MARX, 1969; SMITH e READ, 2008). Em contrapartida, os fungos recebem carboidratos sintetizados pelo hospedeiro.

Diante desses benefícios, fica evidente o interesse da comunidade científica e tecnológica pelas pesquisas sobre os fungos ectomicorrízicos. A possibilidade de cultivar esses fungos em cultura pura abre a perspectiva de sua utilização em programas de inoculação das mudas, de modo a contribuir para aumentar a sobrevivência e o crescimento das plantas e, assim, aumentar a produtividade das plantações florestais. Desta forma, tem-se uma alternativa de fundamental importância para reduzir o uso de fertilizantes e outros insumos químicos, alcançando uma silvicultura mais sustentável e menos dependente de insumos (SMITH e READ, 2008).

Desde 1989, o Laboratório de Ectomicorrizas do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (MIP) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) vem desenvolvendo estudos sobre fungos ectomicorrízicos associados a eucalipto e pínus (OLIVEIRA *et al.*, 1994; 1997; VOIGT *et al.*, 2000; ANDRADE *et al.*, 2000; GIACHINI *et al.*, 2000, 2004; ALVES *et al.*, 2001; NARLOCH, 2002; ROSSI *et al.*, 2002, 2007; MALVAREZ e OLIVEIRA, 2003; SOUZA *et al.*, 2004, 2008).

Dentre os vários estudos, destacam-se aqueles relacionados ao desenvolvimento de tecnologia para a produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos para o setor florestal (ROSSI, 2001; ROSSI *et al.*, 2002, 2007). Nesses estudos, observou-se a importância da qualidade do inóculo (idade e presença de metabólitos tóxicos), da quantidade inicial e do tamanho dos propágulos da suspensão miceliana para melhorar a velocidade de crescimento. Além disso, observou-se que a rápida perda da viabilidade desses inoculantes está relacionada à produção de metabólitos tóxicos.

No processo de obtenção dos inoculantes, a manutenção da viabilidade fúngica apresenta-se como o principal fator limitante, pois os fungos produzem certos metabólitos que parecem contribuir para um processo de auto-intoxicação. É provável que nas condições ambientais normais esses metabólitos sejam absorvidos ou diluídos na solução do solo, mas em cultivo, é necessário identificar e quantificar tais metabólitos de modo a viabilizar a produção comercial dos inoculantes. Além disso, são poucos os estudos sobre metabólitos secundários de fungos ectomicorrízicos em cultivo submerso. Ressalte-se, ainda, a possível existência de um potencial biotecnológico de aplicação para esses metabólitos na inibição do crescimento de microrganismos deletérios.

2. Objetivo Geral

Este trabalho teve como principal objetivo investigar a produção de metabólitos durante o cultivo dos fungos ectomicorrízicos, com ênfase àqueles com efeitos tóxicos sobre o crescimento desses fungos. Visou-se, com isso, estabelecer estratégias para controlar sua produção e, deste modo, manter a viabilidade do inóculo para a produção de inoculantes, contribuir para melhorar a cinética de crescimento, além da manutenção da viabilidade do inoculante durante o período de armazenamento antes de sua utilização pelo produtor de mudas.

2.1. Objetivos Específicos

- (1) Avaliar a influência do pH e do carvão ativo na cinética de crescimento dos fungos e estudar estratégias para inibir ou atenuar a produção de metabólitos tóxicos;
- (2) Verificar o efeito dos metabólitos no crescimento de outros microrganismos com ênfase a patógenos de plantas e do homem;
- (3) Identificar e caracterizar quimicamente os metabólitos responsáveis pela perda de viabilidade do inóculo;
- (4) Instrumentalizar um biorreator *airlift* para controlar as variáveis importantes de cultivo (pH, T, OD), de maneira a compreender os fatores envolvidos no crescimento e viabilidade de fungos ectomicorrízicos;
- (5) Avaliar os parâmetros estequiométricos e cinéticos durante o cultivo controlado de fungo ectomicorrízico.

3. Revisão da Literatura

3.1. O setor florestal brasileiro

O setor florestal brasileiro relaciona-se com diversos outros segmentos industriais tais como: celulose e papel, gráfica, mobiliário e siderurgia (POLZL, 2002). O valor total da produção do setor de base em 2005 foi de US\$ 27,8 bilhões, ou seja, 3,5 % do PIB nacional (SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA, 2006).

Assim como nos demais setores, no meio florestal, é praticamente impossível, nos dias atuais, não agregar o termo "sustentável" à expressão "manejo florestal". E a expressão atual "manejo florestal sustentável", com toda a sua abrangência, complexidade e incertezas, deve ser o foco principal de qualquer discussão ou diagnóstico sobre o tema que envolve o conhecimento, o planejamento, o uso e a conservação dos recursos florestais (INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS, 2002). Desta forma, a extração de madeira em áreas florestais plantadas vem ao encontro de uma utilização mais racional desses recursos renováveis, pois quanto maior a disponibilidade de madeira plantada menor será a utilização da madeira nativa.

De acordo com a Sociedade Brasileira de Silvicultura (2006), as áreas plantadas no Brasil giram em torno de 5,6 milhões de hectares, das quais 61 % são representados pelos eucaliptos e 32 % pelos pinus. O gênero *Eucalyptus* pertence à família *Myrtaceae*, e possui mais de 600 espécies, variedades e híbridos (PAULA, 2005). As espécies de eucaliptos são originárias, em sua maior parte, da Austrália e foram introduzidos no Brasil em 1904, com o objetivo de suprir as necessidades de lenha, postes e dormentes das estradas de ferro na região Sudeste. Na década de 50, passaram a ser produzidos como matéria prima para o abastecimento das fábricas de papel e celulose. Apresentam-se como uma espécie florestal de rápido crescimento e adaptada às condições edafobioclimáticas brasileiras. Na década de 60, graças aos incentivos fiscais do governo, sua expansão foi empreendida. Esses incentivos perduraram até meados dos anos 80. Esse período foi considerado um marco na silvicultura brasileira em face dos efeitos positivos que gerou no setor moveleiro (EMBRAPA FLORESTAS, 2003).

Cabe destacar, que o aproveitamento do eucalipto é praticamente total. Das folhas, extraem-se óleos essenciais empregados em produtos de limpeza e alimentícios, em perfumes e até em medicamentos. A casca oferece tanino, usado no curtimento do couro. O tronco fornece madeira

para sarrafos, lambris, ripas, vigas, postes, varas, esteios para minas, mastros para barco, tábuas para embalagens e móveis. Sua fibra é utilizada como matéria-prima para a fabricação de papel e celulose (AMBIENTE BRASIL, 2006).

O gênero *Pinus* pertence à família *Pinaceae*, integrante da ordem *Coniferales*, vegetais superiores que primeiro se estabeleceram no planeta. As primeiras espécies plantadas no Brasil vieram do sul dos Estados Unidos, e chegaram no país em meados do século XIX. As primeiras experiências comerciais com os pinus no Brasil datam de 1959, no Estado de São Paulo, por meio da produção e exploração racional de madeiras em florestas plantadas. Embora com utilização diferente, o pinus cumpre o mesmo papel do eucalipto, na preservação das florestas nativas (ASSOCIAÇÃO MINEIRA DE SILVICULTURA, 2006).

As espécies do gênero *Pinus* são amplamente utilizadas em reflorestamentos no Brasil, devido principalmente a seu rápido crescimento. A madeira do pinus é utilizada em construções leves ou pesadas, na produção de laminados, compensados, chapas de fibras e de partículas, na produção de celulose e papel, entre outros. O *P. elliottii* também é muito utilizado para a extração de resina. Além disso, também podem ser utilizados na implantação de quebra ventos (ASSOCIAÇÃO MINEIRA DE SILVICULTURA, 2006).

Entretanto, o crescente consumo de madeira no Brasil, além de atingir de forma substancial as matas nativas, não tem sido acompanhado pelos investimentos necessários à expansão e à manutenção do estoque baseado em plantações florestais. A indústria de base florestal está em alerta por causa do descompasso entre a demanda e a oferta de madeira, o que ficou conhecido como “apagão” florestal. A previsão é de que nos próximos anos faltará matéria-prima para atender a cadeia produtiva da madeira, sendo o setor moveleiro aquele que mais sofre com este déficit. Outro aspecto é a elevação dos preços da madeira, devido às dificuldades da exploração da floresta tropical e às grandes distâncias entre as zonas de produção e de consumo (ASSOCIAÇÃO MINEIRA DE SILVICULTURA, 2006).

Nesse contexto, o Brasil busca aumentar a produtividade das florestas plantadas, já que é bastante limitada sua capacidade de aumentar as áreas de plantação. Para isso, a biotecnologia apresenta alternativas, dentre elas, a inoculação das mudas com fungos ectomicorrízicos selecionados, os quais favorecem o crescimento e a sobrevivência das plan-

tas, mesmo em condições adversas de solo (SMITH e READ, 2008).

3.2. Micorrizas

A capacidade das plantas de estabelecer relações mutualísticas com certos grupos de fungo do solo é um fenômeno generalizado na natureza. Essas associações são conhecidas como micorrizas (SMITH e READ, 2008). As micorrizas foram descritas pela primeira vez por Frank (1885) e, de acordo com Peterson *et al.* (2004), representam o mais prevalente tipo de simbiose do planeta.

As micorrizas são classificadas em sete tipos, de acordo com a estrutura morfológica e os simbiontes envolvidos: arbusculares, ectomicorrizas, ectendomicorrizas, orquidóides, ericóides, monotrópides e arbutóides (SMITH e READ, 2008). As ectomicorrizas constituem o tipo predominante nas essências de interesse para a silvicultura, especialmente em regiões temperadas. Elas predominam em plantas das seis famílias mais utilizadas em silvicultura no mundo. Três destas, *Fagaceae*, *Pinaceae* e *Myrtaceae*, são objeto de técnicas intensivas de cultivo (WILCOX, 1990; SMITH e READ, 2008).

Os fungos ectomicorrízicos pertencem, em sua grande maioria, aos filos *Basidiomycota* e *Ascomycota* (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). Entretanto, algumas espécies pertencentes ao filo *Zygomycota* podem, também, formar ectomicorrizas. Estima-se que mais de seis mil espécies fúngicas possam formar esse tipo de micorriza (SMITH e READ, 2008).

Esses fungos são de grande importância para o crescimento e a nutrição das plantas superiores, pois penetram e colonizam o córtex radicular e, a partir dali, formam uma rede miceliana que se espalha no solo e absorve água e nutrientes minerais, translocando-os para a raiz (Figura 1) (SMITH e READ, 2008). Além disso, protegem as raízes contra infecções por parte de outros microrganismos do solo (MARX, 1972). Dessa forma, os fungos ectomicorrízicos funcionam como uma barreira mecânica contra a invasão das raízes por microrganismos patogênicos ou deletérios. Esses fungos proporcionam, também, uma barreira química contra esses patógenos, através da produção de compostos antimicrobianos. Sabe-se que os compostos são produzidos não só durante a associação com as plantas, mas, também, durante o cultivo do fungo sob condições controladas de laboratório (RASANAYAGAM e JEFFRIES, 1992).

A formação de ectomicorrizas é influenciada por vários fatores ambientais, como disponibilidade de nutrientes, pH do solo ou do su-

bstro, temperatura, disponibilidade de água e aeração, intensidade luminosa, fisiologia da planta hospedeira, interações com microrganismos do solo, toxicidade de certos pesticidas. Depende, também, do tipo e modo de aplicação do inóculo ectomicorrízico (SMITH e READ, 2008).

As raízes colonizadas apresentam alterações morfológicas, que se traduzem num crescimento mais lento e em espessamento terminal que aumenta a superfície de absorção. Uma vez que os simbiontes vegetais mais comuns neste tipo de micorriza são árvores, e os fungos envolvidos constituem um importante componente da biomassa nos mais variados ecossistemas florestais (das florestas de coníferas às savanas e florestas úmidas), as ectomicorrizas contribuem intensamente para a nutrição e reciclagem de nutrientes (BRUNDRETT *et al.*, 1996).

As ectomicorrizas são amplamente reconhecidas pelos efeitos positivos que proporcionam ao crescimento da planta, melhorando a absorção de nutrientes, especialmente o fósforo, aumentando o volume de solo explorado e a tolerância a estresses bióticos e abióticos. Dentre estes últimos, citam-se os patógenos radiculares e os níveis elevados de metais, além de extremos de temperatura (SMITH e READ, 2008). Os benefícios dessa associação para as plantas estão bem documentados, justificando o enorme interesse biotecnológico nesse tipo de associação.

Vários mecanismos já foram propostos para explicar esses benefícios para a planta hospedeira. A absorção de nutrientes pela planta gera uma zona de reduzida concentração de nutrientes ao redor das raízes, especialmente para aqueles elementos químicos de baixa mobilidade no solo (LAPEYRIE *et al.*, 1991). Desta forma, parte dos filamentos fúngicos que estão associados às raízes da planta hospedeira funcionam como um sistema radicular adicional, explorando maior volume no solo e absorvendo nutrientes não disponíveis para as raízes, bem como a água (SMITH e READ, 2008).

Além disso, os fungos ectomicorrízicos disponibilizam certos nutrientes naturalmente indisponíveis para os vegetais. Através da secreção de ácidos orgânicos, tais como o ácido cítrico e o ácido oxálico, o fungo pode disponibilizar o fósforo, que possui grande importância para a nutrição dos vegetais (COSTA *et al.*, 2003).

Com relação à proteção contra patógenos, mais de 100 espécies de fungos ectomicorrízicos produzem antibióticos em cultura pura, incluindo compostos antifúngicos e antivirais (RASANAYAGAM e JEFFRIES, 1992). A utilização de fungos ectomicorrízicos para prote-

ção de raízes contra patógenos tem sido investigada em estudos com condições ambientais controladas (KOPE e FORTIN, 1989). Vários mecanismos foram propostos para explicar esse fato, citando-se a presença de manto, uma barreira mecânica à penetração de patógenos; a produção de antibióticos e ácidos pelo fungo; a competição por sítios de infecção e por nutrientes; a indução de respostas de defesa da raiz, além do favorecimento de uma microbiota rizosférica benéfica que protege a planta contra organismos deletérios (GARBAYE, 1994; SMITH e READ, 2008).

O fungos ectomicorrízicos reduzem a absorção dos metais pesados pela planta, pois produzem compostos quelantes, diminuindo sua disponibilidade para a parte aérea da planta. Estes ficam imobilizados temporariamente nas hifas e não são transferidos para as células hospedeiras (CARNEIRO *et al.*, 2001; FOMINA *et al.*, 2005), reduzindo, assim, os efeitos tóxicos sobre a planta.

Ainda não está bem delineado o mecanismo pelo qual as ectomicorizas proporcionam maior tolerância a extremos de temperatura à planta hospedeira. Supõe-se que a síntese de proteínas termorresistentes, bem como efeitos indiretos na nutrição e na relação hídrica da planta sejam os responsáveis por tal mecanismo (GARBAYE e CHURIN, 1997; DI PIETRO *et al.*, 2007).

3.3. Metabolismo de carbono e nitrogênio em fungos ectomicorrízicos

Estudos recentes acerca do metabolismo de carboidratos em fungos ectomicorrízicos demonstraram que a trealose e o manitol são os principais compostos de carbono armazenados no micélio dos fungos ectomicorrízicos (CASTRO *et al.*, 2002; SMITH e READ, 2008). A exsudação de outros açúcares e polióis pelo fungo ectomicorrízico *Suillus bovinus* foi descrita por Yu-Ping *et al.* (1999). A exsudação e o armazenamento são dois processos que podem ser afetados pelas condições externas de cultivo, como por exemplo, a temperatura e o pH. Nos fungos, a trealose é sintetizada a partir da glicose-6-fosfato pela trealose-6-fosfato-sintetase e está presente em grandes quantidades em muitos fungos ectomicorrízicos como, por exemplo, *Laccaria proxima* e *Hebeloma cylindrosporum*. Estudos desenvolvidos por Martin *et al.* (1987) mostraram que a síntese da trealose no fungo ectomicorrízico *Cenococcum geophilum* ocorre, principalmente, quando a velocidade de crescimento diminui devido à exaustão da glicose. Segundo os mesmos

autores, a trealose é, provavelmente, um "ponto chave" para o armazenamento de compostos de carbono durante a transição da fase de crescimento para a fase estacionária. Além disso, a produção de trealose pode estar associada a uma resposta de tolerância do fungo, quando o mesmo é submetido a condições de estresse de crescimento (CASTRO *et al.*, 2002).

O manitol pode ser metabolizado por certos fungos através de enzimas que constituem o chamado "ciclo do manitol". Este ciclo *in vivo* não está bem compreendido e, em muitos basidiomicetos, a rota de formação de manitol ainda não foi elucidada (MARTIN *et al.*, 1987; RAMSTEDT *et al.*, 1990). Estudos realizados por Ramstedt *et al.* (1990) mostraram que após a exaustão de glicose do meio de cultura líquido, durante o cultivo sob agitação do basidiomiceto *Piloderma croceum*, 75 % do manitol armazenado pelo fungo durante a fase de crescimento foram utilizados como fonte endógena de carbono. Estudos sugerem que o catabolismo do manitol está envolvido na produção de co-fatores para a síntese de ácidos graxos (MARTIN *et al.*, 1984a). A Figura 1 mostra o esquema simplificado provável da conversão de carboidratos em fungos ectomicorrízicos.

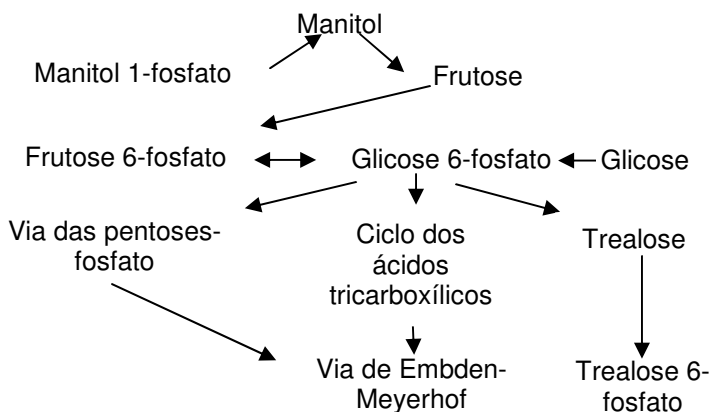


Figura 1. Esquema simplificado da conversão de carboidratos por fungos ectomicorrízicos (MARTIN *et al.*, 1987).

A contribuição dos fungos ectomicorrízicos para a nutrição das plantas resulta da capacidade de as hifas fúngicas conectarem as raízes a uma maior área de solo. Também, por apresentarem habilidade de meta-

bolizar compostos que as plantas não assimilam diretamente, como por exemplo, proteínas e aminoácidos (JARGEAT *et al.*, 2000).

A capacidade dos fECM de utilizar formas orgânicas de nitrogênio é provavelmente limitada. Entretanto, muitos apresentam a capacidade de crescimento em meios contendo proteínas como única fonte de nitrogênio o que pode ser explicado pela secreção de proteases específicas no meio de cultura (MARTIN *et al.*, 1987; FINLAY *et al.*, 1992). Zhu *et al.* (1994) purificaram e caracterizaram uma proteinase ácida extracelular produzida pelo fECM *Hebeloma crustuliniforme* que apresentou grande atividade na utilização de nitrogênio. As proteinases são nutricionalmente importantes por serem, em sua grande maioria, produzidas sob determinadas condições de indução e muitas dessas estão sujeitas à repressão catabólica, como por exemplo, na presença de glicose, amônio ou enxofre no meio de cultura.

Estudos em culturas de fungos ectomicorrízicos mostram que NH_4^+ é a forma inorgânica de nitrogênio que apresenta melhor assimilação (MARTIN *et al.*, 1987, 1994). Esta assimilação está relacionada a duas rotas metabólicas alternativas, a que utiliza a glutamato desidrogenase (GD) e a que utiliza a glutamina sintetase (GS)/glutamato sintase (GOS). Nos ascomicetos, *Candida utilis* e *Cenococcum geophilum*, as enzimas GD e GS estão intimamente envolvidas na assimilação de NH_4^+ , derivado tanto de fontes externas de nitrogênio quanto de processos metabólicos internos, como o catabolismo de aminoácidos (MARTIN *et al.*, 1988). No entanto, nos ascomicetos *Aspergillus nidulans*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae* e nos basidiomicetos, *Stropharia semiglobata* e *Pisolithus tinctorius*, as enzimas envolvidas são a GS e a GOS (MARTIN *et al.*, 1994). Apesar dos vários estudos, a regulação das rotas de assimilação do nitrogênio em fungos ectomicorrízicos necessita de mais pesquisas para um melhor entendimento das relações metabólicas entre os simbioses.

O conhecimento dessas rotas metabólicas e das exigências nutricionais dos fungos é fundamental para a otimização dos processos de cultivo visando à produção de inoculantes e sua aplicação nos programas de produção de mudas em silvicultura.

3.4. Produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos

A inoculação de fungos ectomicorrízicos, visando à produção de mudas mais resistentes às condições ambientais, é uma das principais a-

plicações biotecnológicas das ectomicorrizas. A utilização de um inoculante específico requer que o fungo seja fisiológica e ecologicamente compatível com a planta e o ambiente onde ele será empregado. Sendo assim, os pré-requisitos para a implementação de programas de inoculação ectomicorrízica são: a seleção do simbiote fúngico eficiente e o desenvolvimento de métodos de produção de inoculantes em larga escala (MOLINA e TRAPPE, 1982; GARBAYE, 1990; BRUNDRETT *et al.*, 1996; RODRIGUES *et al.*, 1999; ALVES *et al.*, 2001).

Vários tipos de inoculantes ectomicorrízicos foram testados e produzidos nas últimas décadas. Dentre eles destacam-se os inoculantes à base de esporos fúngicos e os micelianos ou vegetativos (BRUNDRETT *et al.*, 1996; ALVES *et al.*, 2001). A Figura 2 mostra os principais tipos de inoculantes de fungos ectomicorrízicos.

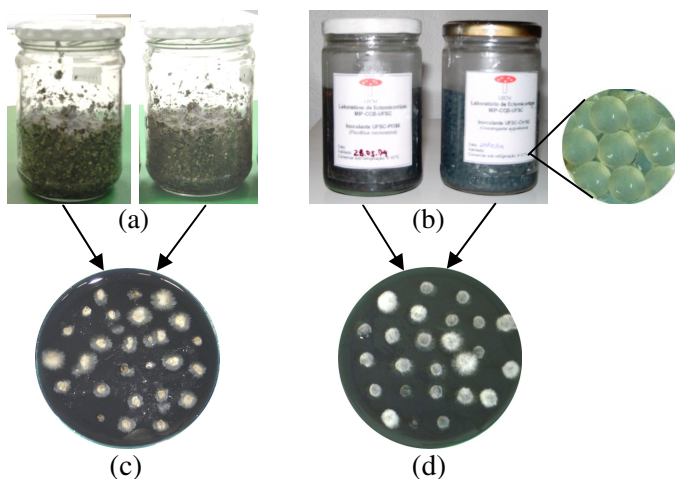


Figura 2. Detalhes de inoculantes de fungos ectomicorrízicos: (a) micélio em turfa/vermiculita; (b) micélio encapsulado em alginato de cálcio. Viabilidade de inoculantes em meio sólido: (c) inoculante turfa/vermiculita; (d) inoculante em alginato de cálcio (ROSSI, 2006).

Embora muito utilizados em diversos países, os inoculantes à base de esporos fúngicos apresentam limitações, dentre elas a falta de controle sobre a eficiência dos fungos introduzidos e a alta probabili-

dade de contaminação com patógenos. O método mais bem sucedido envolve o cultivo do micélio em uma mistura de turfa-ver-miculita suplementada com meio nutritivo líquido. A vermiculita proporciona ao substrato uma aeração adequada e o micélio fica protegido no seu interior. A adição de turfa possibilita o ajuste de pH para faixa ideal, usualmente 4,8 – 5,5 (GARBAYE, 1990). Conforme destacam Alves *et al.* (2001), este método tem sido bastante utilizado com os fungos *Pisolithus tinctorius*, *Hebeloma crustuliniforme* e *Laccaria laccata* para inoculações em mudas de *Pinus* spp. e *Pseudotsuga menziesii* na França e nos EUA.

Outra técnica consiste no cultivo do fungo via processo submerso, com posterior encapsulação do micélio em alginato de cálcio. A etapa de encapsulação permite ao micélio sobreviver por mais tempo no solo, ou no substrato de plantio, além de facilitar o transporte e o armazenamento do inoculante. Esse tipo de inoculante vem sendo empregado rotineiramente na França para produção de inoculante do fungo ectomicorrízico *Laccaria bicolor*, isolado S238N, pelo Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), para inoculação de mudas de *Pseudotsuga menziesii* (SELOSSE *et al.*, 1998).

Para outros fungos, porém, o método de fermentação líquida precisa ser otimizado, pois ocorrem dificuldades na multiplicação, devido às contaminações freqüentes que acabam comprometendo a qualidade do inoculante, principalmente na produção em grande escala (ROSSI, 2006). Isso acontece, sobretudo, porque os fungos ectomicorrízicos apresentam crescimento lento quando comparados a microrganismos de vida livre, contaminantes habituais dos cultivos. Além disso, esses fungos quando submetidos à fragmentação, etapa necessária tanto ao processo de cultivo em meio líquido quanto à encapsulação, liberam metabólitos que promovem uma auto-inibição. Isso pode ser explicado pelo fato de que durante a fragmentação do micélio, enzimas e metabólitos secundários são liberados, os quais, isoladamente ou quando reagem entre si, tornam-se inibitórios ao próprio fungo (LAPEYRIE e BRUCHET, 1985). A identificação desses metabólitos e a elaboração de estratégias para sua inibição e/ou atenuação proporcionaria a obtenção de inoculantes com maior viabilidade.

No entanto, como qualquer outro microrganismo aeróbio, os fungos ectomicorrízicos necessitam de contato com oxigênio e nutrientes para seu crescimento, o que indica a fermentação em meio líquido como o processo mais adequado para o seu cultivo. Nesse contexto, muitas metodologias têm sido testadas para produção de inóculo por este processo. A fermentação em biorreatores *airlift* apresenta-se como uma al-

ternativa de produção de inóculo em grande escala, já que este tipo de biorreator propicia uma melhor transferência de massa quando comparado a biorreatores convencionais de tanque agitado. Além disso, proporcionam menos estresse físico às células (ROSSI *et al.*, 2002). Com isso, pode-se reduzir o tempo de cultivo e as contaminações, melhorando, assim, a produtividade do processo.

3.5. Biorreator *airlift*

Biorreatores não convencionais são estudados em muitos laboratórios de engenharia bioquímica, uma vez que o sucesso de um processo fermentativo industrial depende fortemente da eficiência do reator. Particularmente no que diz respeito à transferência de oxigênio, a qual está relacionada diretamente aos custos de produção.

Os reatores *airlift* são reatores pneumáticos divididos em duas zonas: uma com escoamento direcionado para cima e outra com escoamento direcionado para baixo. A zona de expansão do gás, chamada de *riser*, possui maior *gás-holdup* (fração volumétrica de gás na zona de dispersão) que a zona livre de gás, chamada de *downcomer* (GOUVEIA *et al.*, 2003).

Estruturalmente, os biorreatores *airlift* são divididos em dois tipos: os de circulação interna e os de circulação externa. Os de circulação interna são formados por um único tanque com divisões dentro da coluna de bolhas. Nos de circulação externa, o *riser* e o *downcomer* são conectados por duas seções horizontais próximas ao topo e à base, permitindo a recirculação do meio de cultura (ROSSI, 2001).

A baixa demanda energética para aeração e agitação requerida em biorreatores *airlift* durante um processo fermentativo tem aumentado o interesse pela utilização desses biorreatores em processos industriais (GOUVEIA *et al.*, 2003). São equipamentos de simples construção, boa agitação e proporcionam reduzido estresse físico às células, devido às menores forças de cisalhamento. Estes reatores são particularmente apropriados para processos que demandam uma distribuição uniforme e rápida dos componentes de reação e para sistemas multifásicos que necessitam de altas taxas de transferência de massa e calor.

Os reatores *airlift* também são utilizados em indústrias químicas, em processos catalíticos e também na cloração de etileno (DHAOUADI *et al.*, 2006). Entretanto, as aplicações práticas desses biorreatores de-

pendem da capacidade do biorreator em atingir as velocidades requeridas de transferência de massa a um custo de operação aceitável (GOUVEIA *et al.*, 2003).

Zheng *et al.* (2005) estudaram a produção de biomassa microbiana a partir de hidrolisado de palha de arroz em biorreatores *airlift* e obtiveram redução dos custos de operação no processo quando comparados a biorreatores convencionais. Furtado *et al.* (1998) estudaram o efeito do tempo de retenção hidráulica sobre a nitrificação em biorreator *airlift* no tratamento de efluentes de uma refinaria de petróleo, obtendo 85 % de remoção de nitrogênio amoniacal para um tempo de retenção de 10 horas. Wang e McNeil (1995) utilizaram um biorreator *airlift* com circulação externa para produção de um exopolissacarídeo fúngico, com resultados equivalentes aos maiores níveis obtidos em reatores convencionais do tipo tanque agitado (STR). Gravilescu e Roman (1998) cultivaram microrganismos unicelulares e filamentosos em dois tipos de biorreatores *airlift* (circulação externa e tubos concêntricos) para obtenção de bacitracina, cefalosporina C e nistatina, e compararam alguns resultados aos obtidos em STR. Esses autores verificaram que a transferência de oxigênio foi 38 % maior nos *airlift* do que nos STR. Além disso, a eficiência energética aumentou 30-40 % quando comparada ao sistema convencional.

Bonnarme *et al.* (1993) estudaram a produção de metabólitos por *Phanerochaete chrysosporium* em STR e *airlift*. Os resultados mostraram que houve incremento na produção desses metabólitos quando o cultivo era realizado em *airlift*.

Com relação à produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos em biorreator *airlift*, os primeiros estudos obtiveram resultados promissores que indicam o potencial dessa tecnologia para a área de inoculantes micorrízicos (ROSSI *et al.*, 2002, 2003; ROSSI, 2006). A obtenção de inoculantes é, até o presente, um dos maiores desafios para o estabelecimento de programas rotineiros de inoculação das mudas de forma a explorar benefícios advindos da simbiose micorrízica.

3.6. Metabólitos secundários de fungos ectomicorrízicos

Os fungos são utilizados tanto para a produção de metabólitos primários, como álcoois, ácidos orgânicos, enzimas e vitaminas e esteróis, como para a produção de metabólitos secundários como natiibióticos, alcalóides e pigmentos. Também têm sido empregados para a biorremediação de ambientes comprometidos por altos índices de po-

luentes, como lixo orgânico, compostos naturais recalcitrantes e xenobióticos, assim como para a bioissorção de metais pesados e de compostos radioativos que podem ocorrer naturalmente (ARORA *et al.*, 1992).

As razões para a produção desses metabólitos secundários ainda não são bem compreendidas, sabe-se, porém, que resultam de um metabolismo não balanceado ou não controlado, ocorrendo usualmente após o término da fase de crescimento. É provável que a adaptabilidade do fungo para a rápida utilização de substratos variados seja devida a um nutriente limitante, que pode ser carbono ou nitrogênio, o qual pode proporcionar um ambiente favorável à produção de metabólitos secundários (NANDAN e RAISUDDIN, 1992).

O estudo do metabolismo de fungos e sua utilização permite a aplicação industrial para a produção de metabólitos primários e secundários. Mais de 3000 metabólitos de origem fúngica já foram identificados, mas seu número real deve ser bem maior, pois as atividades fisiológicas e bioquímicas de muitos fungos ainda não foram estudadas e perfeitamente descritas (NANDAN e RAISUDDIN, 1992).

Nesse sentido, muitos são os trabalhos que buscam espécies fúngicas com potencial para produção de metabólitos com diversas aplicações biotecnológicas (COSTA *et al.*, 2001). Ressalte-se que alterações nas condições de cultivo podem potencializar a produção da substância bioativa de interesse.

Os fungos ectomicorrízicos apresentam grande potencial biotecnológico para a recuperação de solos contaminados por metais pesados, pois os metais são complexados em componentes da parede celular como quitina, celulose, derivados de celulose e melaninas. No entanto, a natureza química das substâncias complexantes desses metais em células fúngicas ainda não está bem elucidada.

Dessa forma, estudos direcionados à identificação e quantificação de metabólitos secundários produzidos por fungos ectomicorrízicos *in vitro* são de grande importância para a otimização dos processos de produção de inoculantes. Além disso, muitos desses metabólitos podem apresentar inúmeras aplicações biotecnológicas e possuir alto valor comercial podendo ser utilizados em outros setores de produção.

Os metabólitos secundários produzidos pelos fungos ectomicorrízicos também apresentam propriedades antifúngicas capazes de inibir microrganismos patogênicos de plantas. Estudos demonstram uma correlação entre a atividade antifúngica e a produção de ácidos orgânicos e compostos fenólicos solúveis por fungos ectomicorrízicos.

Rasanayagam e Jeffries (1992) estudaram a interação de *Pythium ultimum* com uma variedade de fungos ectomicorrízicos *in vitro*. Dentre os 19 isolados de fungos ectomicorrízicos, 16 apresentaram atividade inibitória contra o patógeno. Essa atividade parece ser devida à secreção de metabólitos de caráter ácido para o meio de cultura, tornando-o inviável para o crescimento do patógeno. Suh *et al.* (1991) também reportam a produção de metabólitos antifúngicos pelo fECM *Pisolithus tinctorius*. Os autores verificaram que o cultivo do fungo em meio sólido inibiu fortemente os microrganismos *Fusarium solani*, *Geotrichum candidum*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Verticillium dahliae*. Kasuya *et al.* (1996) verificaram a presença de compostos com atividade antifúngica em extratos líquidos de *Pisolithus tinctorius*, *Scleroderma flavidum*, *Amanita pantherina* e *Paxillus* sp. Contudo, são necessárias mais pesquisas para um melhor entendimento dos mecanismos que levam à produção dos compostos inibidores e sobre os mecanismos de ação desses compostos sobre os organismos afetados (YAMAJI *et al.*, 2005).

3.7. Identificação de metabólitos secundários de microrganismos

A identificação e caracterização de metabólitos secundários de microrganismos tem sido objeto de muitas investigações. No entanto, para que se avance nesses estudos é necessário o emprego de diferentes análises químicas. Quando se tem um alto grau de certeza sobre a identificação de um composto metabólico isolado, a confirmação pode ser obtida através de reações químicas ou pelo seu comportamento em sistemas cromatográficos. Entretanto, para compostos cujas estruturas não estão totalmente identificadas, métodos adicionais como espectrometria de massa e ultravioleta, espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear (RMN) devem ser aplicados a fim de elucidar a estrutura molecular do composto (HOUGHTON e RAMAN, 1998). Nesse sentido, o tópico tem por objetivo apresentar informações necessárias para o entendimento das técnicas e análises utilizadas para identificação e caracterização de metabólitos secundários.

Os procedimentos cromatográficos são os mais utilizados no fracionamento de misturas moleculares. A cromatografia pode ser definida de forma simplificada como a distribuição diferencial dos compostos entre duas fases, na qual uma se movimenta em relação à outra. Essas fases são chamadas de móvel e estacionária, respectivamente. A fase móvel é um líquido, gás ou um fluído supercrítico que flui através da fa-

se estacionária, a uma determinada velocidade e interage com as moléculas do soluto carregando-as consigo. A fase estacionária é um líquido ou um sólido com grande área superficial, que por seletividade interage com as moléculas do soluto (HOUGHTON e RAMAN, 1998).

A cromatografia é baseada no equilíbrio dinâmico que é estabelecido entre a distribuição de um soluto em duas fases. Esse equilíbrio dinâmico consiste na passagem contínua da molécula do soluto entre as duas fases. Entretanto, cada molécula gasta um determinado tempo em ambas as fases e a proporção desse tempo gasto depende da atração relativa da substância pelas duas fases. A concentração de equilíbrio é chamada de coeficiente de distribuição e a interação relativa por uma das fases se chama de afinidade. Conclui-se, então, que a cromatografia é uma sucessão de equilíbrios múltiplos estabelecidos em uma série de pequenas unidades de ambas as fases.

Atualmente existem inúmeras técnicas baseadas no princípio da cromatografia. A fim de melhor apresentá-las pode-se classificar as mesmas de acordo com determinados critérios. Com relação ao estado físico da fase móvel, tem-se:

- cromatografia gasosa: fase móvel é um gás;
- cromatografia líquida: fase móvel é um líquido.

Como dito anteriormente, a fase estacionária pode ser líquida ou sólida, sendo assim de acordo com o estado físico dessa fase tem-se:

- cromatografia de fase estacionária sólida;
- cromatografia de fase estacionária líquida.

Além dos métodos cromatográficos, há os métodos espectroscópicos, muitos deles disponíveis para determinação da estrutura química de um composto isolado. Os métodos espectroscópicos mais frequentemente utilizados são: infravermelho (IV), ultravioleta (UV), ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de massa (SM).

Pode-se dizer que o espectro de infra-vermelho de uma substância é uma relação da frequência de absorção (número de onda) das possíveis vibrações de uma molécula em função da intensidade da absorção na região de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} . Fica evidente, portanto, que

os principais parâmetros a ser analisados na interpretação dos espectros de IV são: a frequência de absorção e a intensidade da absorção.

A intensidade de absorção está diretamente relacionada à magnitude da polaridade da ligação durante a vibração, ou seja, quanto mais polar for a ligação, mais intensa será a absorção.

Cada vibração de uma ligação em determinada molécula resulta na absorção de energia em frequências específicas resultando no que chamamos “banda de absorção”. Então, grupos funcionais, como por exemplo, acetonas, álcoois e ésteres, apresentam bandas características de absorção. Entretanto, cabe ressaltar que em alguns casos podem apresentar mais de uma banda de absorção característica. Além disso, diferentes grupos funcionais podem apresentar as mesmas bandas de absorção (SOCRATES, 1997).

A absorção molecular na região do ultravioleta e do visível depende da estrutura eletrônica da molécula. A absorção de energia é quantizada e conduz à passagem dos elétrons de orbitais do estado fundamental para orbitais de maior energia em um estado excitado. A seletividade da absorção no ultravioleta é uma vantagem, entretanto, uma vez que é possível reconhecer grupos característicos em moléculas de complexidade bastante variável. Como uma grande porção de uma molécula relativamente complexa pode ser transparente no ultravioleta, pode-se obter espectro semelhante ao de moléculas muito mais simples (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

A técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) é, basicamente, uma outra forma de espectroscopia de absorção, semelhante à espectrometria de infra-vermelho ou à de ultravioleta. Sob condições apropriadas em um campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequências em uma frequência regida pelas características estruturais da amostra. A absorção é função de determinados núcleos da molécula. Um espectro RMN é um registro gráfico das frequências dos picos de absorção contra suas intensidades (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

A técnica de RMN tem sido muito utilizada como uma ferramenta não invasiva para o estudo bioquímico, estrutural e ambiental de entidades biológicas. Além disso, é amplamente utilizada em estudos de fisiologia celular e energética de microrganismos (MARTIN *et al.*, 1984b). Viereck *et al.* (2004) utilizaram RMN para estudar o metabolismo de fungos micorrízicos arbusculares, no que tange à concentração de polifosfatos e outras formas de fósforo, em hifas externas e raízes colonizadas, usando como modelo a associação entre *Glomus intraradices* e o pepino (*Cucumis sativus*). Martin *et al.* (1994)

monitoraram a assimilação de nitrogênio pelo micélio do fungo ectomicorrízico *Laccaria bicolor* durante a assimilação de NH_4^+ e a biossíntese de aminoácidos através de RMN obtendo informações relevantes sobre o metabolismo de nitrogênio na fase exponencial e estacionária durante o cultivo do fungo.

No entanto, em certas circunstâncias o espectro de RMN não fornece informações suficientes para a caracterização de um metabólito, em especial quando o composto é deficiente em prótons ou quando o mesmo pode ser quimicamente intercambiado com o solvente (VILLAS-BÔAS e GOMBERT, 2006).

Outro método, já citado anteriormente e muito utilizado é a espectrometria de massa, que apresenta várias vantagens em relação a outros métodos de análise química, dentre elas destacam-se a alta sensibilidade e praticidade. Além disso, apresenta a possibilidade de confirmar a identidade dos componentes presentes na amostra e de detecção e identificação de compostos desconhecidos, ou cuja presença na amostra é inesperada. Esta técnica, quando combinada com outras, como por exemplo, cromatografia e eletroforese, amplia enormemente a capacidade de análise química de amostras biológicas complexas (VILLAS-BÔAS e GOMBERT, 2006).

Esse método consiste resumidamente em submeter a substância a um bombardeio com feixe de elétrons e registrar quantitativamente o resultado na forma de fragmentos iônicos positivos. Este registro é um espectro de massa. A separação dos fragmentos iônicos positivos faz-se com base na massa. Como citado anteriormente, essa técnica quando acoplada à cromatografia, líquida ou gasosa, eletroforese, entre outras, proporciona grande capacidade de análise de misturas complexas, onde em certos casos não há necessidade de nenhum tipo de fracionamento.

A cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a espectrometria de massa (CLAE-EM), é um dos métodos mais sensíveis de análise e quantificação de compostos, sendo muito utilizada em pesquisas de produtos naturais. Contudo, a técnica mais poderosa para determinação estrutural de substâncias inéditas com novos esqueletos e, principalmente, em misturas biologicamente ativas, é a CLAE-RMN. Apesar disso, até o presente momento são poucos os laboratórios de pesquisa em Produtos Naturais no Brasil que dispõem deste equipamento. A maior limitação é o seu altíssimo preço além do alto custo da manutenção (BOLZANI *et al.*, 2002).

Com o emprego dessas técnicas, espera-se que seja possível identificar os metabólitos tóxicos, produzidos durante o crescimento ou durante a fragmentação do micélio para o encapsulação do inoculante.

A manutenção da viabilidade fúngica após a fragmentação da biomassa tem se apresentado como limitante, seja para a encapsulação do fungo (produção de inoculante), seja para sua inoculação em biorreator. Dessa forma, os experimentos foram conduzidos para a obtenção de informações preliminares dos metabólitos responsáveis pelo processo de auto-inibição. Como por exemplo, se são metabólitos não voláteis, de origem extra ou intra-celular, ou se possuem propriedades natimicrobianas, capazes de inibir o crescimento de outros microrganismos.

4. Material e Métodos

4.1. Descrição dos isolados fúngicos ectomicorrízicos

Os isolados de fungos ectomicorrízicos UFSC-Pt116 e UFSC-Pt188 (*Pisolithus microcarpus*), simbiontes de eucalipto, e UFSC-Sc42 (*Scleroderma* sp.) e UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*), simbiontes de pinus, foram utilizados neste estudo.

O isolado UFSC-Pt116, já estudado anteriormente por Rossi *et al.* (2002) e Rossi (2006) para fins de produção de inoculantes, apresenta crescimento lento, tanto em meio sólido em placas quanto em meio líquido estático quando comparado a outros isolados do mesmo gênero e, principalmente, quando comparados a fungos saprófitas. Durante seu cultivo nesses meios, produz pigmentos de coloração marrom. Ao ser fragmentado em solução salina, perde a viabilidade (aproximadamente em 24 horas). Já o isolado UFSC-Pt188, da mesma espécie, apresenta crescimento rápido em meio de cultura sólido em placas, porém crescimento lento em meio líquido estático, onde provoca abaixamento do pH do meio a níveis muito baixos, entre 2,5 e 3,0. Da mesma forma que o isolado anterior, quando fragmentado em solução salina, perde sua viabilidade em menos de 24 horas, se não for adicionado carvão ativo à suspensão miceliana.

O fungo UFSC-Sc42, uma espécie não identificada do gênero *Scleroderma*, apresenta, quando jovem, um micélio de cor clara e que se torna pardo no decorrer do tempo de cultivo (cerca de 20 dias). Produz intensa quantidade de pigmentos, mas de coloração mais clara que os produzidos pelos isolados de *Pisolithus*. É o único isolado que ainda continua a liberar os pigmentos após fragmentação em solução salina ou após encapsulação. Apresenta intensa auto-intoxicação ao ser fragmentado. Seu crescimento é razoável, tanto em placa quanto em meio líquido estático.

Dentre os quatro, o isolado UFSC-Rh90 é o que apresenta as melhores respostas, pois cresce bem em meio sólido em placas e em meio líquido estático em frascos. É o isolado ideal para comparação com os demais, pois é o único entre os quatro que cresce muito bem em condições submersas em biorreator sob agitação e aeração contínua. Apresenta alta viabilidade após ser fragmentado, mesmo sem a adição de carvão ativo. Adicionando-se carvão, sua viabilidade permanece por vários anos (ROSSI, 2006). O micélio deste fungo, quando jovem, apresenta coloração branca, tornando-se marrom com o tempo. A pig-

mentação que provoca no meio não é forte e, ao contrário do isolado UFSC-Pt 188, o pH do meio não atinge níveis tão críticos, mesmo no final do cultivo com consumo total da fonte de carbono.

4.2 Meios de cultura

Os meios Melin-Norkrans modificado (MARX, 1969) e Pridham-Gottlieb, modificado por Kuek (1996) e Rossi *et al.* (2002), doravante denominados MNM e PGKM, respectivamente, eram empregados para a manutenção dos isolados e os estudos experimentais. A composição básica desses meios é apresentada no Quadro 1:

Quadro 1. Composição dos meios de cultura utilizados para os estudos com isolados de fungos ectomicorrízicos.

Nutrientes	MNM (g.L ⁻¹)	PGKM (g.L ⁻¹)
Glicose	10,0	14,0
Peptona de soja	-	5,00
Extrato de levedura	-	-
Extrato de malte	3,00	3,00
CaCl ₂	0,050	-
NaCl	0,025	-
NH ₄ NO ₃	-	0,90
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,75	-
NH ₂ CONH ₂	-	0,10
KH ₂ PO ₄	0,50	0,264
K ₂ HPO ₄	-	0,628
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,15	0,330
CuSO ₄ .5H ₂ O	-	0,0021
MnCl ₂ .4H ₂ O	-	0,0004
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-	0,0006
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	0,0005
FeCl ₃ (solução 1%)	1,2 mL	-
Tiamina-HCl	100 µg	-
Micronutrientes	Quantidade (g.L⁻¹)	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,00200	
H ₃ BO ₃	0,00300	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,00003	
KI	0,00075	

Uma variação diluída do meio PGKM também foi utilizada, contendo (em g.L⁻¹): glicose 10,0; peptona de soja 2,5; extrato de malte 1,5 e sais 70 % da formulação. Na maioria das vezes os meios de cultura eram complementados com solução de micro-nutrientes. O pH dos meios de cultura era ajustado a 5,8 antes da esterilização, utilizando-se solução equimolar de ácido cítrico/citrato de sódio (A/C) ou HCl/NaOH 0,1 M. Quando necessário, os meios de cultura eram complementados com micro-nutrientes.

Os fungos eram mantidos em meio sólido PGKM em placas de Petri, contendo 0,2 % de carvão ativo, incubados à temperatura de 25 ± 1 °C, em incubadora BOD. As repicagens para meio fresco de mesma composição eram realizadas a cada 20 ou 30 dias.

4.3. Preparo do inóculo e inoculação

Para semear o meio em frascos, eram utilizados discos de cultura sólida com no máximo 20 dias. Esses discos eram colocados em meio de cultura sólido durante 2 dias para confirmar a viabilidade do micélio e a ausência de contaminação. Cerca de 5 a 8 discos viáveis e livres de contaminação eram colocados em 25 mL de meio de cultura em frascos erlenmeyers de 250 mL e incubados à temperatura de 25 ± 1 °C, durante 15 dias. Os frascos foram fechados com papel alumínio e selados com um filme de PV para evitar contaminação. Para inoculação do biorreator, o micélio obtido nas culturas em frascos era fragmentado em solução salina (0,85 % de NaCl), a 3600 rpm durante 20 s, em liquidificador esterilizado. À suspensão miceliana obtida era adicionado carvão ativo (0,2 %) para impedir a perda de viabilidade do micélio. O processo fornecia uma concentração inicial aproximada de biomassa de 0,25 g.L⁻¹. Essa suspensão era adicionada ao meio de cultura (5 L) e transferida para o biorreator, utilizando-se uma conexão asséptica. Durante o preparo do meio de cultura, adicionava-se polipropilenoglicol (0,4 mL.L⁻¹) para evitar a formação de espuma.

4.4. Condições de cultivo

Os cultivos foram realizados em meio líquido, à temperatura de 25 ± 1 °C, em frascos estáticos (em estufa BOD) e em biorreator *airlift*. Durante o cultivo no biorreator, a temperatura era mantida constante por meio de um banho termostatizado conectado a um troca-

dor de calor instalado numa das seções do biorreator. O processo era em batelada até a exaustão da principal fonte de carbono (glicose), operando-se à vazão específica de ar, de até 0,52 vvm, suficiente para suprir a demanda de oxigênio dissolvido para concentrações celulares de até 6 g.L⁻¹, no que diz respeito ao fungo *Rhizopogon nigrescens* (UFSC-Rh90) (ROSSI, 2006). No cultivo realizado em condições controladas, a vazão de ar foi variável e suficiente para manter a concentração de oxigênio dissolvido acima de 60 % da concentração de saturação.

4.5. Biorreator *airlift*

Utilizou-se um biorreator *airlift* com circulação externa ($A_d/A_r=0,11$ e $H/D=12,5$), projetado por Rossi (2006). Este foi feito em aço inox com volume útil de 5 L e equipado com uma sonda polarográfica da série InPro6000, com transmissor modelo 4100e da Mettler Toledo®, para as medidas de oxigênio dissolvido (Figura 3). Neste trabalho foram realizadas melhorias neste sistema possibilitando também medidas de pH, e o registro e controle das principais variáveis do processo (OD, pH, vazão de ar, T), conforme será descrito no item 4.9.7.

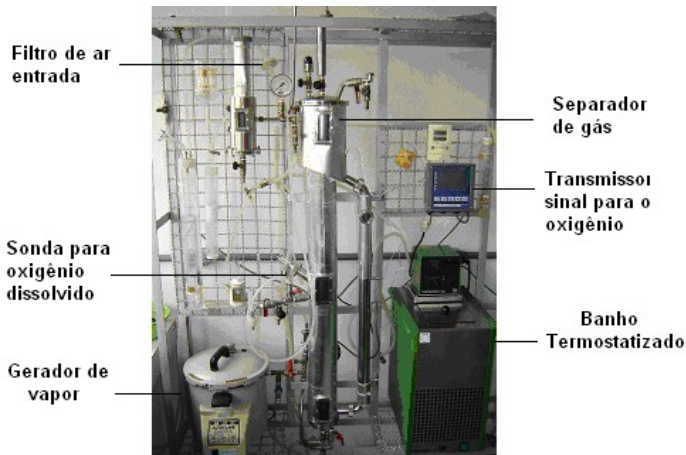


Figura 3. Biorreator *airlift* utilizado nos ensaios experimentais e seus acessórios.

4.6. Procedimentos de desinfecção e esterilização

A esterilização do meio de cultura e dos utensílios era realizada em autoclave a 121 °C. Meios de cultura com volumes inferiores a 1 L eram esterilizados durante 15 min, enquanto os meios com volumes de 5 L, para cultivo em biorreator, eram esterilizados durante 30 min. A jarra do liquidificador utilizado para preparação das suspensões micelianas era em aço inox esterilizável. Os procedimentos de inoculação dos meios e de repicagem dos isolados eram realizados sob condições assépticas em capela de fluxo laminar vertical.

Todos os acessórios para manipulação direta com o fungo eram esterilizados durante 20 min. O biorreator era esterilizado sob temperaturas entre 100 e 121 °C, obtidas através de uma entrada de vapor, gerado por uma autoclave de 8 L, conectada através de uma derivação da entrada de ar (Figura 6). Durante a esterilização dos pontos de alimentação, amostragem e descarga, entrada de ar, filtro de saída de gases, manômetro e sensores de oxigênio dissolvido (OD) e de pH, a temperatura era mantida entre 100 e 110 °C devido à despressurização causada pelas sangrias e à limitada geração de vapor. Após esta fase, que durava 120 min, o biorreator era pressurizado até atingir 121 °C, permanecendo por mais 30 min. Cabe salientar, que antes do procedimento de esterilização do biorreator, o mesmo passava por uma desinfecção com solução de cloreto de benzalcônio.

4.7. Determinações analíticas

4.7.1. Obtenção das amostras

Nos cultivos em frascos, a amostragem foi destrutiva, com todo o conteúdo sendo coletado e posteriormente armazenado a -20 °C, até o momento das análises. Já nos estudos em biorreator, foram retiradas cerca de 40 mL da cultura em intervalos de tempo que dependiam do andamento do cultivo, ou seja, de 2 a 3 dias no início e passando a ser diários com o aumento progressivo da biomassa. Como citado anteriormente, as amostras foram mantidas congeladas até o momento das análises.

4.7.2. Determinação da biomassa seca

Tanto para o cultivo em frascos, quanto para o cultivo em biorreator, um volume conhecido das amostras era filtrado em papel de filtro de peso conhecido, com o auxílio de uma bomba de vácuo. As amostras eram lavadas com água destilada e, posteriormente, colocadas em estufa a 75 °C até peso constante. A massa seca foi, então, obtida pela diferença de peso.

4.7.3. Determinação de glicose

Para a determinação de glicose residual, era aplicado um teste enzimático colorimétrico para fluídos orgânicos da Bioliquid®. A técnica fundamenta-se na oxidação da D-glicose a ácido glicônico e peróxido de hidrogênio, pela glicose oxidase. O peróxido de hidrogênio, na presença da peroxidase, reage com o hidroxibenzoato de sódio e a 4-amino-fenazona para formar o complexo quinona que apresenta cor vermelha. A intensidade da cor formada é proporcional à concentração da glicose na amostra (TRINDER, 1969).

4.7.4. Determinação de compostos fenólicos totais

Realizou-se a determinação quantitativa de compostos fenólicos no filtrado de cultura do fECM *Scleroderma* sp. (UFSC-Sc42) cultivado por 15 dias em meio líquido PGKM sem carvão ativo em frascos estáticos. A técnica empregada foi a da 4-aminoantipirina (4-AAP) (YANG e HUMPHREY, 1975). Essa técnica consiste em adicionar 0,1 mL de ferricianeto de potássio ($K_3Fe(CN_6)$) 5 % em tampão glicina 0,1 M, pH 9,7 e 1 mL de 4-AAP, a um volume conhecido de amostra (1,0 mL). A densidade óptica dessa mistura de reação foi medida a 505 nm em espectrofotômetro. O controle negativo (branco) foi representado pelo meio de cultura PGKM estéril e os reagentes. Para a quantificação compararam-se os resultados de com aqueles obtidos com uma curva padrão de fenóis para a qual obteve-se uma equação ($y = 0,0047x - 0,0065$; $R^2 = 0,99$) que permitiu calcular os teores de fenóis das amostras. Os resultados foram expressos em miligramas de fenóis por litro de filtrado de cultura.

4.7.5. Dosagem de cor

A produção de pigmentos é comum na maioria dos fungos ectomicorrízicos quando cultivados em meios artificiais e pode ser o indicativo de algum fator inibidor como a presença de metabólitos tóxicos. A medida da variação da intensidade de cor do meio de cultura durante ou após o cultivo de fungos foi feita medindo-se a absorbância a 465 nm em espectrofotômetro da *Bel Photonics* modelo 1100 em pH 7,6 em amostras do meio (SOARES e DURAN, 2001). Antes da leitura da absorbância, a amostra foi submetida à centrifugação.

4.8. Obtenção das grandezas cinéticas e estequiométricas

O cultivo empregado foi do tipo descontínuo ou em batelada. Este geralmente é dividido em fases. A fase *lag* representa o período em que às células adaptam-se as novas condições ambientais impostas. Esta adaptação inclui a formação de enzimas e intermediários necessários ao início do crescimento. O tempo de duração dessa fase está relacionado ao estado fisiológico do fungo, à morfologia e ao tipo de inóculo utilizado. Inóculos na forma de esporos necessitam de um certo tempo para sua germinação, enquanto que os inóculos peletizados, que precisam ser fragmentados antes do processo de inoculação, demandarão um certo tempo para sua regeneração (PAPAGIANNI, 2004).

A fase exponencial é caracterizada por um aumento significativo da massa celular. A velocidade de crescimento das hifas fúngicas não depende apenas do isolado utilizado, mas também, das condições físico-químicas ambientais. Em meio sólido, o crescimento exponencial resulta de uma autocatalise pela produção de ramificações que se estendem a uma velocidade radial linear. A redução na velocidade específica de crescimento ocorre quando as condições de cultivo não são favoráveis ao fungo, como por exemplo, quando há limitação de um nutriente, valores críticos de pH ou acúmulo de produtos metabólitos inibitórios. Monod (1942) propôs um modelo (Equação 1) de crescimento microbiano baseado somente no efeito do substrato limitante.

$$\mu_x = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_S} \quad \text{Eq. (1)}$$

onde:

μ_X : velocidade específica de crescimento celular (dia^{-1});

μ_{\max} : velocidade específica máxima de crescimento celular (dia^{-1});

S: concentração de substrato (g.L^{-1});

K_S : constante de saturação.

No que diz respeito à fase de desaceleração do crescimento, muitos são os fatores que estão relacionados à mesma. A cinética de crescimento dessa fase, embora muito descaracterizada, apresenta muita importância para os processos biotecnológicos, tendo em vista que é justamente nesse período que ocorre a maior produção de metabólitos secundários. A desaceleração do crescimento devido à limitação de oxigênio é particularmente interessante para cultivos de fungos filamentosos, devido à influência de sua morfologia sobre as propriedades reológicas. Em grande parte dos cultivos, quando o crescimento é disperso, o fluido assume um comportamento não-Newtoniano. A viscosidade aparente aumenta com o crescimento fúngico, o que reduz o transporte de nutrientes, oxigênio e calor. O incremento da energia requerida para agitação e transferência de oxigênio eficientes demanda maior custo em cultivos de maior escala (PAPAGIANNI, 2004).

A fase estacionária pode ser definida resumidamente como o balanço entre o crescimento e a morte celular. Entretanto, se o microrganismo acumula materiais intracelulares durante a fase de desaceleração, percebe-se um pequeno incremento na massa celular durante o metabolismo endógeno desses compostos de reserva (PAPAGIANNI, 2004).

Neste contexto, a obtenção das grandezas cinéticas de um processo fermentativo facilita o monitoramento da fermentação como um todo. Além disso, permite descrever o comportamento de um microrganismo (velocidade específica de crescimento, conversão de substrato em células, produtividade, dentre outros) frente a um determinado substrato e um tipo de reator (REGULY, 2000).

4.8.1. Velocidade específica de crescimento

O modelo proposto por Monod (1942), citado anteriormente, emprega o conceito de velocidade específica de crescimento (μ) que pode ser relacionada ao crescimento celular, ao consumo de substrato e a for-

mação de produto. Essa para um processo descontínuo pode ser descrita pelas seguintes equações:

$$\mu_X = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad \text{Eq. (2)}$$

$$\mu_S = -\frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad \text{Eq. (3)}$$

$$\mu_P = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad \text{Eq. (4)}$$

onde:

μ_X : velocidade específica de crescimento celular (dia^{-1});

μ_S : velocidade específica de consumo de substrato ($g_{\text{sub}} \cdot g_{\text{cel}}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$);

μ_P : velocidade específica de formação de produto ($g_{\text{prod}} \cdot g_{\text{cel}}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$).

A velocidade específica é independente da concentração celular. Ela expressa a capacidade efetiva das células em sintetizar o produto ou utilizar o substrato. No entanto é importante ressaltar que, os fungos utilizados neste trabalho crescem na forma de *pellets*. Estudos cinéticos desenvolvidos por Rossi (2006) mostraram que o tamanho do inóculo (concentração de biomassa *versus* tamanho inicial dos propágulos) pode afetar a velocidade específica de crescimento. Nesse caso específico, apesar de complexo, a padronização do inóculo é fundamental para obtenção das grandezas cinéticas, bem como para a produção de inoculantes.

Na fase exponencial de crescimento celular, a velocidade específica de crescimento celular torna-se constante e máxima (μ_{max}), dessa forma tem-se:

$$X = X_{0i} \cdot e^{\mu_{\text{max}}(t-t_i)} \quad \text{Eq. (5)}$$

onde:

X_{0i} : concentração celular no instante de início da fase exponencial de crescimento.

Ou escrevendo-se de outra forma:

$$\ln(X) = \ln(X_{0i}) + \mu_{\max} \cdot t \quad \text{Eq. (6)}$$

Plotando-se $\ln(X)$ contra o tempo para os dados experimentais, segundo a equação (6), obtém-se μ_{\max} através do coeficiente angular da reta obtida. Valores de μ_X ao longo do tempo de cultivo foram obtidos utilizando o método geométrico de cálculo das derivadas proposto por Le Duy e Zajic (HISS, 2001), utilizando-se uma planilha de cálculos do Excel[®]. Os dados experimentais, sempre sujeitos a flutuações, foram ajustados por trechos utilizando-se 2 equações polinomiais de segunda e terceira ordem. A partir do alisamento dos pontos experimentais, foram utilizados vinte pontos para a determinação da curva de velocidade específica de crescimento, $\mu_X(t)$.

Também, pode-se obter o tempo de duplicação de biomassa, onde $X = 2X_{0i}$:

$$T_{\text{dup}} = \frac{\ln(2)}{\mu_{\max}} \quad \text{Eq. (7)}$$

4.8.2. Fator de conversão de substrato a células

Este parâmetro é importante para determinar a concentração celular (X) em cultivo de fungos filamentosos e em tratamento de efluentes. Para um processo em batelada o fator de conversão pode ser definido como:

$$Y_{x/s} = \frac{dX}{-dS} \quad \text{Eq. (8)}$$

Integrando-se para $Y_{x/s}$ constante, tem-se:

$$Y_{x/s} = \frac{(X - X_0)}{(S_0 - S)} \quad \text{Eq. (9)}$$

onde:

X_0 : concentração celular inicial (g.L^{-1});
 X : concentração celular no instante t (g.L^{-1});
 S_0 : concentração inicial de substrato (g.L^{-1});
 S : concentração residual de substrato no instante t (g.L^{-1}).

Representando-se os dados em um gráfico $X=f(S)$, o coeficiente angular da tangente à curva em qualquer instante é $Y_{X/S}$. Este fator também pode ser obtido através de:

$$Y_{X/S} = \frac{\mu_X}{\mu_S} \quad \text{Eq. (10)}$$

4.8.3. Produtividade em biomassa

A produtividade é um parâmetro muito utilizado na avaliação do desempenho de um processo fermentativo. Neste trabalho, foi avaliada a produtividade em biomassa, ou seja, sem considerar os tempos “mortos” de cultivo, como aqueles empregados no preparo do inóculo, inoculação, limpeza do biorreator, entre outros.

$$P_X = \frac{X_m - X_0}{T_F} \quad \text{Eq. (11)}$$

onde:

P_X : produtividade em biomassa ($\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$);
 X_m : concentração máxima de biomassa (g.L^{-1});
 T_F : tempo total de cultivo (dia)

4.9. Procedimentos Experimentais

4.9.1. Monitoramento da viabilidade de fungos ectomicorrízicos

Estes ensaios objetivaram monitorar a viabilidade dos isolados fúngicos. Isso foi considerado necessário por não ser claro se os metabó-

litos eram formados no exato momento da fragmentação da biomassa fúngica, ou no decorrer do tempo de incubação ou armazenamento da suspensão miceliana. Decidiu-se, assim, monitorar a viabilidade dos fungos ectomicorrízicos de modo a poder indicar em que fase do processo o fungo perde sua viabilidade e, também, identificar que tipos de metabólitos estariam presentes nesse exato momento.

4.9.1.1. Influência do carvão ativo na manutenção da viabilidade de fungos ectomicorrízicos

Este ensaio (Figura 4) teve por objetivo verificar a influência do carvão ativo na manutenção da viabilidade dos fungos ectomicorrízicos *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt188) e *Rhizopogon nigrescens* (UFSC-Rh90). Cada fungo foi cultivado em meio líquido PGKM, por 15 dias, em frascos estáticos. Posteriormente, a biomassa foi separada do meio de cultura e fragmentada em liquidificador sob condições assépticas em capela de fluxo de laminar. A fragmentação foi feita em solução salina 0,85 %, para evitar choques osmóticos que viessem a prejudicar as células fúngicas.

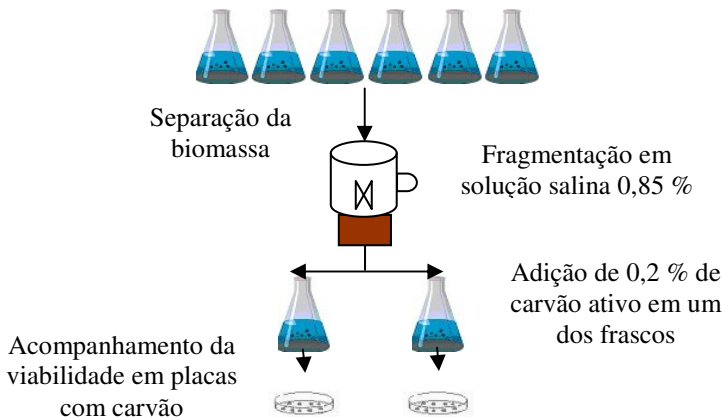


Figura 4. Esquema simplificado do experimento sobre a influência do carvão ativo na manutenção da viabilidade após fragmentação.

Depois de fragmentado, o volume da suspensão foi dividido em duas porções. A uma delas adicionou-se carvão ativo (0,2 %), enquanto

a outra permaneceu sem carvão. A viabilidade do micélio foi acompanhada em intervalos de tempo pré-determinados, através da coleta de 2 mL de cada suspensão (com carvão e sem carvão) que foram inoculados em placas contendo meio sólido PGKM com carvão.

4.9.1.2. Influência de processos oxidativos na manutenção da viabilidade de fungos ectomicorrízicos

Para comprovar se a auto-inibição, após a fragmentação do micélio, seria decorrente de um processo oxidativo, foram realizados dois experimentos. Num deles, semelhante ao descrito no item anterior, substituiu-se o carvão ativo pelo ácido ascórbico, substância anti-oxidante, na mesma proporção (0,2 %).

Os fungos ectomicorrízicos utilizados nesse estudo foram *Scleroderma* sp. (UFSC-Sc42) e *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt116). A esterilização do ácido ascórbico foi feita através de filtração em filtro bacteriológico, tipo Millipore® (diâmetro do poro de 0,45 µm). Os experimentos foram realizados em duplicata.

Noutro experimento, ao invés de se adicionar um agente anti-oxidante à suspensão miceliana, como no caso anterior, a mesma foi mantida livre de oxigênio. Para isso, o fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt188) foi cultivado por um período de 15 dias em frascos estáticos. Posteriormente, a biomassa foi separada do meio de cultura e fragmentada em solução salina em liquidificador sob condições assépticas em capela de fluxo de laminar.

Depois de fragmentada, o volume de suspensão obtido foi dividido em duas partes. Numa das partes o gás nitrogênio foi borbulhado até a exaustão de oxigênio. De acordo com Rossi (2006), isso ocorre quando o eletrodo de oxigênio dissolvido marca um sinal de corrente zero. A viabilidade foi acompanhada inoculando-se, em meio sólido PGKM com carvão, amostras de 2 mL coletadas de cada suspensão, em tempos pré-determinados (0, 24, 48, 72 e 120 horas). Após cada coleta, o borbulhamento de nitrogênio era novamente efetuado e o frasco lacrado com parafilme, permanecendo livre de oxigênio até a abertura na próxima coleta. A Figura 5 mostra o aparato experimental utilizado nesse ensaio, onde se utilizou uma membrana filtrante para manter a assepsia durante o borbulhamento do nitrogênio.

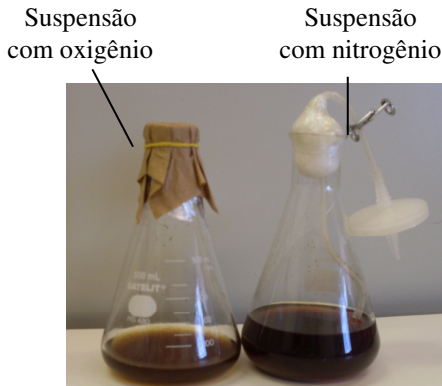


Figura 5. Aparato experimental utilizado no ensaio sobre a influência do oxigênio na manutenção da viabilidade do fECM *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt188).

4.9.2. Manutenção do pH do meio de cultura: influência na produção de biomassa de fungos ectomicorrízicos em meio líquido

O pH é um fator muito importante para o crescimento de microrganismos, estando relacionado à atividade enzimática e, indiretamente, à formação de produtos metabólicos indesejáveis (SUNDARI e ADHOLEYA, 2003). Os fungos utilizados neste experimento foram *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt188) e *Scleroderma* sp. (UFSC-Sc42), que provocam, geralmente, significativa acidificação do meio de cultura durante seu cultivo, devido à produção de ácidos orgânicos (YAMAJI *et al.*, 2005; ROSSI, 2006).

Assim, na etapa preliminar de cultivo em frascos, foi verificado se a manutenção de um pH constante, através da adição de soluções tampões, poderia melhorar a produção de biomassa fúngica. Os tampões succinato de sódio (0,15 M) e citrato de sódio (0,10 M), assim como as concentrações utilizadas, foram estabelecidos anteriormente (ROSSI, 2006). Os fungos foram cultivados em meio líquido em frascos estáticos por 15 dias em incubadora BOD a 25 ± 1 °C.

Para isso foi utilizado um planejamento experimental tipo estrela (BARROS NETO *et al.*, 1996), com dois fatores ($k = 2$), contendo quatro ensaios (2^k) nos níveis codificados através das Equações 12 e 13 em -1 (nível mínimo) e +1 (nível máximo), um ensaio no ponto central e

quatro ensaios distribuídos rotacionalmente a uma distância $\alpha = (2^k)^{1/4} = 1,414$ do ponto central. Como respostas, avaliaram-se a produção de biomassa e a variação de pH. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), com o programa *Statgraphics for Windows* (Manugistics®). Através da análise dos dados foram obtidas as quantidades específicas de solução tampão (região de trabalho) que incrementaram a produção de biomassa.

O experimento foi realizado em duplicata, comparando-se os resultados com um ensaio sem adição de tampão (testemunha). O Quadro 2 apresenta a matriz do planejamento fatorial estrela, com os níveis reais das variáveis e seus respectivos níveis codificados.

$$X_1 = \frac{T_c - 50}{10} \quad \text{Eq. (12)}$$

$$X_2 = \frac{T_s - 30}{10} \quad \text{Eq. (13)}$$

Quadro 2. Matriz do planejamento fatorial estrela com os níveis reais das variáveis e os níveis codificados.

Ensaio	Tc (mL.L ⁻¹)	Ts (mL.L ⁻¹)	X ₁	X ₂
1	40	20	-1	-1
2	40	40	-1	+1
3	60	20	+1	-1
4	60	40	+1	+1
5	35,9	30	-1,414	0
6	64,1	30	+1,414	0
7	50	15,9	0	-1,414
8	50	44,1	0	+1,414
9	50	30	0	0
10	50	30	0	0

Tc= Tampão citrato de sódio; Ts= Tampão succinato de sódio; X1: nível codificado do volume de tampão citrato; X2: nível codificado do volume de tampão succinato.

Esses resultados foram, posteriormente, utilizados nos cultivos em biorreator, onde empregou-se o mesmo isolado e os níveis -1 de citrato de sódio (40 mL.L^{-1}) e +1 de succinato de sódio (40 mL.L^{-1}) foram utilizados na formulação dos 5 L de meio de cultura para inoculação do biorreator.

4.9.3. Influência do carvão ativo no crescimento de fungos ectomicorrízicos em meio líquido

Sabendo-se da importância do carvão ativo na manutenção da viabilidade dos fECM, objetivou-se nesse estudo verificar, também, a influência desse componente no cultivo em meio líquido dos fungos em estudo. Para isso, os quatro isolados fúngicos foram cultivados em meio líquido PGKM, com e sem carvão ativo, em frascos estáticos por 22 dias, à temperatura de $25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, em estufa do tipo BOD. Após esse período foram avaliados o pH, a biomassa e o fator de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$) nos meios de cultura com sem carvão ativo. Para cada isolado de fECM, os experimentos foram realizados em triplicata e os dados analisados através da comparação entre as médias pelo teste de Tukey.

4.9.4. Detecção de metabólitos tóxicos extracelulares e a influência do carvão ativo na adsorção desses compostos

A importância desses experimentos reside no fato de os metabólitos tóxicos ao fungo poderem ser também excretados para o meio de cultura. Por outro lado, podem apresentar propriedades antifúngicas contra outros microrganismos, sejam patógenos do homem ou fitopatógenos, apresentando importância biotecnológica. Em todos os estudos, foi comparada a eficácia do carvão na adsorção desses metabólitos, para se obter mais informações sobre o mecanismo pelo qual o carvão aumenta a viabilidade dos fungos ectomicorrízicos.

4.9.4.1. Produção de metabólitos inibidores não voláteis

Nesse experimento, os isolados de fungos ectomicorrízicos, UFSC-Rh90 e UFSC-Sc42, foram estudados quanto a seu potencial de auto-inibição, utilizando-se a técnica descrita por Dennis e Webster

(1971). Para isso, cada isolado foi cultivado em meio de cultura sólido PGKM, com e sem carvão ativo, em placas de Petri (20 mL de meio por placa), pH ajustado a 5,8 antes da autoclavagem. A superfície do meio foi coberta com um disco de papel celofane, de igual diâmetro, previamente lavado e esterilizado. Na posição central, foi depositado um disco de 7 mm contendo micélio, obtido de cultura anterior em meio sólido, e previamente testado quanto à viabilidade e ausência de contaminação (Figura 6).

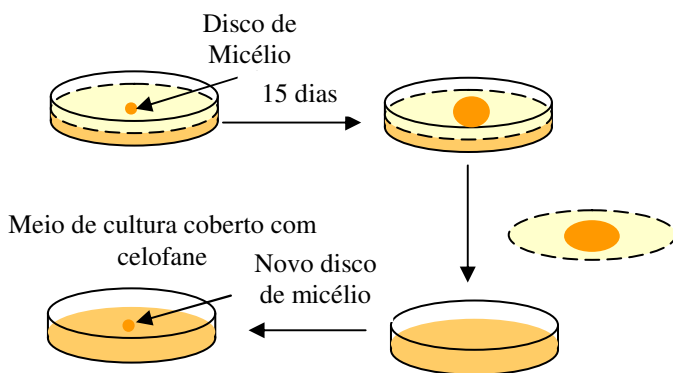


Figura 6. Esquema simplificado para o ensaio sobre a produção de metabólitos inibidores não voláteis.

Foram utilizados diferentes períodos de incubação (15, 30 e 45 dias) a fim de identificar em que fase do cultivo ocorre maior produção de metabólitos tóxicos. Após esses períodos, o celofane, juntamente com o fungo, foi retirado e, na mesma posição, foi colocado um novo disco contendo micélio do mesmo isolado. As culturas foram novamente incubadas nas mesmas condições e pelos mesmos intervalos de tempo mencionados anteriormente. Ao final, foi determinado o diâmetro da colônia nas placas contendo meio com carvão e sem carvão ativo a fim de verificar o grau de inibição.

As testemunhas foram submetidas ao mesmo procedimento, porém com meio de cultura diluído PGKM em placas de Petri.

4.9.4.2. Efeito de filtrado de cultura de fungo ectomicorrízico no crescimento do fungo produtor e de fungo fitopatogênico

Este ensaio visou detectar a presença de metabólitos inibitórios em filtrado de cultura de fungo ectomicorrízico. Partiu-se de um cultivo do fungo *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt188) em meio PGKM líquido, em frascos estáticos, em incubadora BOD a 25 ± 1 °C, onde o fungo cresceu até que o principal substrato (glicose) fosse totalmente convertido. Ao final desse cultivo, a biomassa foi separada do meio por filtração e secada em estufa a 75 °C até peso constante. Determinou-se o pH do meio líquido restante (filtrado) e o teor residual de glicose e esse filtrado foi, então, adicionado em diferentes concentrações (5, 10, 15 e 30 %) a meio de cultura PGKM sólido para testar seu efeito sobre o crescimento dos fungos indicadores.

A escolha do isolado UFSC-Pt188, *Pisolithus microcarpus*, para este experimento, deveu-se ao fato de ter sido este, dentre os quatro em estudo, o isolado que apresentava os maiores problemas de auto-inibição, como mencionado no item 4.1.

Os organismos indicadores foram o próprio isolado e o fungo fitopatogênico, *Fusarium oxysporum* isolado de mudas de videira. Esses organismos foram previamente cultivados em meio de cultura sólido PGKM em placas, com incubação a 25 ± 1 °C, durante 20 dias. Dessas culturas, foram obtidos discos (7 mm de diâmetro) de meio cobertos de micélio que foram semeados no meio de cultura contendo diferentes concentrações do filtrado de cultura do fungo ectomicorrízico. Antes da semeadura no meio experimental, os discos foram testados quanto à viabilidade do micélio pelo mesmo procedimento descrito no item anterior. Somente discos que apresentavam micélio com retomada de crescimento foram utilizados.

A Figura 7 mostra o esquema simplificado deste experimento. O filtrado foi adicionado ao meio que foi mantido a 55 °C para permitir a mistura antes de o meio solidificar. Todos os procedimentos foram realizados assepticamente em capela de fluxo de laminar. Após a solidificação do meio de cultura depositou-se, no centro da placa um disco contendo micélio dos organismos teste. O tratamento testemunha foi preparado sem a adição do filtrado fúngico. Como foram testadas diferentes concentrações do filtrado, o meio de cultura foi preparado, de modo a manter constante a concentração do substrato para o volume utilizado de 250 mL. Para cada combinação de concentração do filtrado-

organismo teste, o meio de cultura foi testado com e sem adição de carvão e, para cada caso, o experimento foi conduzido em quintuplicata.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando-se para isso o programa *Statgraphics for Windows* (Manugistics®).

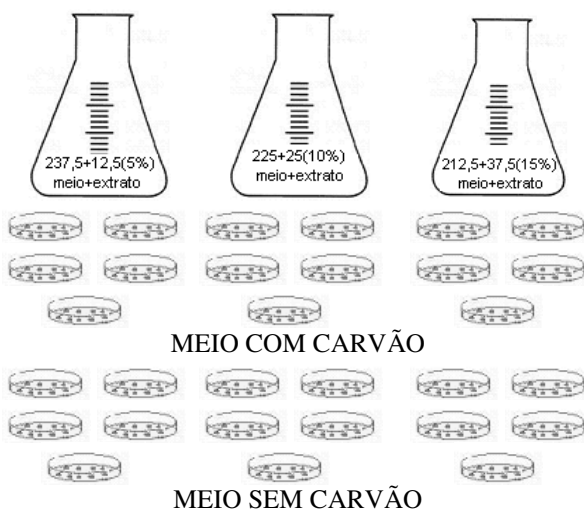


Figura 7. Esquema simplificado do procedimento experimental para estudar o efeito do filtrado fúngico de fECM no crescimento do fungo produtor e de fungo fitopatígeno.

4.9.4.3. Testes de antagonismo de fungos ectomicorrízicos em relação a fitopatógeno em meio sólido

Os fungos ectomicorrízicos *Rhizopogon nigrescens* (UFSC-Rh90) e *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt188) foram utilizados em testes de antagonismo por confrontação direta com o fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Os fungos foram inicialmente cultivados separadamente, em meio de cultura PGKM sólido com carvão, incubados a 25 ± 1 °C, durante 20 dias. Após esse período, as culturas foram utilizadas para obtenção de discos de meio cobertos de micélio. Esses discos foram, então, utilizados para montagem das culturas de confrontação em meio de cultura sólido PGKM com e sem carvão, em placas de Petri.

Cada fungo ectomicorrízico foi confrontado ao fungo fitopatogênico, inoculando-se um disco de um lado da placa em posição oposta ao local onde foi colocado um disco de cultura do fitopatógeno, na superfície do meio de cultura (Figura 10). No tratamento testemunha, ao invés do disco contendo micélio do fungo ectomicorrízico, foi colocado somente um disco de meio estéril. Essas culturas foram incubadas a 25 ± 1 °C, em incubadora BOD, durante 20 dias. Após esse período, mediu-se o diâmetro da área de crescimento do fitopatógeno na posição frontal em relação à área de crescimento do fungo ectomicorrízico. Os resultados foram expressos em termos de diâmetro do halo de inibição.

4.9.4.4. Atividade antifúngica e antibacteriana dos metabólitos extracelulares

Para esse estudo, os isolados fúngicos UFSC-Sc42 e UFSC-Rh90 foram cultivados em meio líquido, com e sem carvão, em frascos estáticos. Após a exaustão da principal fonte de carbono (glicose), a biomassa foi retirada e os meios de cultura (filtrado fúngico) submetidos à liofilização a -40 °C, em liofilizador modelo *Edwards*. Para cada isolado, foram obtidos 2 filtrados fúngicos, oriundos do meio com e sem carvão.

A atividade antifúngica e antibacteriana desses filtrados fúngicos foi avaliada em relação a quatro microrganismos teste: as bactérias, *Escherichia coli* (ATCC25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), consideradas patógenos oportunistas, e a bactéria *Bacillus cereus* (ATCC 11778) e o fungo *Candida albicans* (ATCC14053), também patogênicos ao homem (SMÂNIA *et al.*, 1995), através do teste de difusão. Para isso, o filtrado fúngico liofilizado foi colocado em suspensão em dimetilsulfóxido (DMSO) e depositado em poços de 7 mm de diâmetro, perfurados em meio de cultura sólido específicos para cada tipo de microrganismo testado. O tratamento testemunha continha somente 50 µl de DMSO em cada poço (Figura 8). Uma suspensão de células do microrganismo teste foi espalhada na superfície do meio e, após incubação a 37 °C por 24 horas, para bactéria, e 35 °C por 72 horas, para fungo, a atividade inibitória dos filtrados fúngicos liofilizados foi verificada pela formação de halo de inibição do crescimento do microrganismo teste ao redor dos poços.

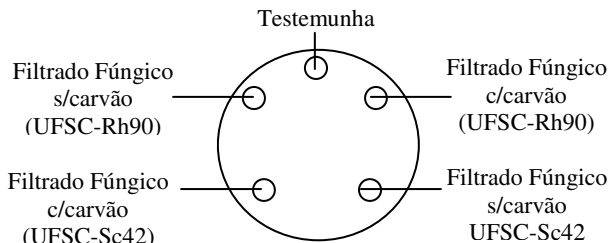


Figura 8. Esquema do teste de difusão dos filtrados fúngicos liofilizados contra microrganismos patogênicos.

4.9.5. Caracterização dos metabólitos tóxicos extracelulares e intracelulares

4.9.5.1. Separação e identificação

O protocolo utilizado para a extração e purificação dos metabólitos de origem extra e intracelular foi adaptado de protocolos rotineiramente utilizados para extração de metabólitos de plantas (PIZZOLATTI *et al.*, 2008; JOHANN *et al.*, 2008; DUARTE *et al.*, 2007). Para o processo de separação e identificação dos metabólitos tóxicos, os isolados de fúngicos ectomicorrízicos, UFSC-Rh90 e UFSC-Pt188, foram cultivados em meio de cultura sólido PGKM em placas de Petri. Após 20 dias de incubação a 25 ± 1 °C, discos de 7 mm de diâmetro obtidos dessas culturas foram transferidos para 25 mL de meio líquido PGKM em frascos erlenmeyer de 250 mL. O meio foi previamente esterilizado a 121 °C por 20 min. Em cada frasco, foram colocados cinco a oito discos de cultura. O cultivo foi conduzido até que a principal fonte de carbono (glicose) fosse consumida. Em seguida, o micélio foi separado por filtração, passando-se duas vezes consecutivas em papel de filtro Whatman nº 1, com o auxílio de uma bomba de vácuo.

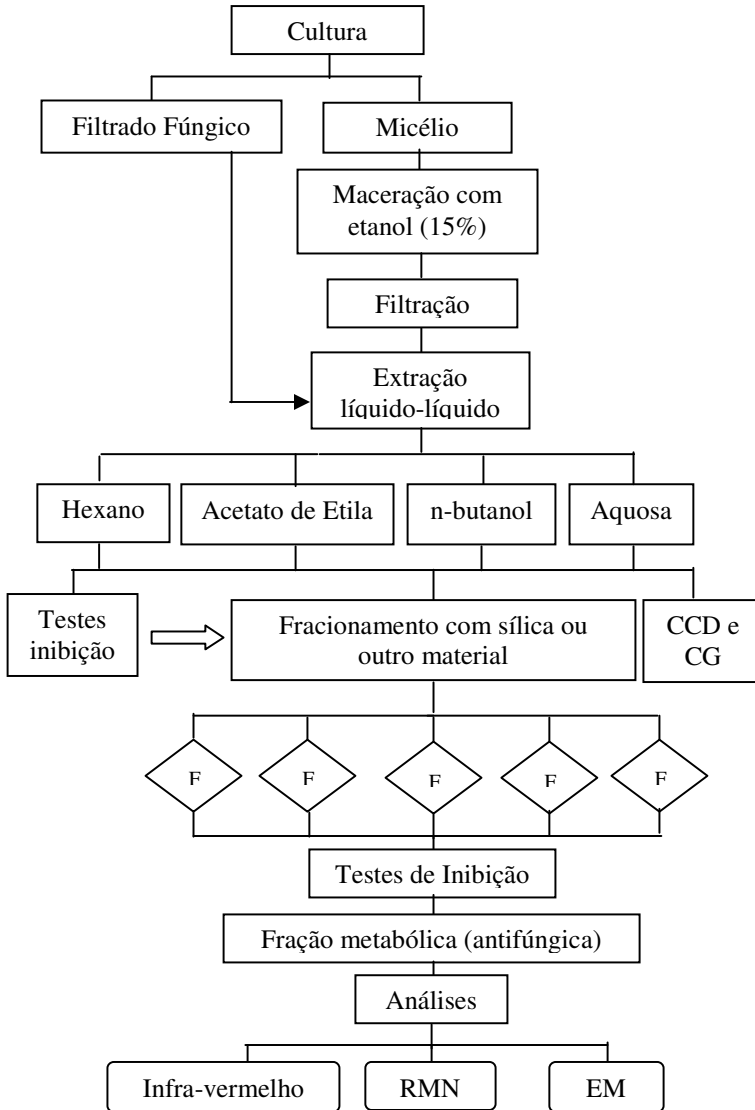


Figura 9. Esquema das etapas de purificação e identificação dos metabólitos secundários intra e extracelulares de fungos ectomicorrízicos.

O micélio foi triturado em liquidificador e macerado com uma solução aquosa de etanol a 15 % durante uma semana. Logo após, realizou-se uma nova filtração, obtendo-se novamente um resíduo sólido e uma fração líquida com etanol. A este resíduo sólido foi adicionada, mais uma vez, solução aquosa de etanol a 15 % e a mistura foi submetida a nova maceração por mais uma semana. Em seguida, foi feita nova filtração, misturando-se, então, os dois filtrados resultantes da primeira e segunda maceração, de modo a obter um extrato bruto da fração intracelular.

A fase líquida da cultura, doravante denominada filtrado fúngico, e a fração intracelular foram submetidas ao processo de extração líquido líquido (método de fracionamento) na presença de solventes orgânicos (hexano, acetato de etila e/ou n-butanol) com posterior concentração em evaporador rotatório, até eliminação do solvente. Esta técnica consiste na separação das fases aquosas e orgânicas onde cada componente presente no filtrado fúngico apresentará diferentes solubilidades nestas duas fases. A fase aquosa restante do processo de extração foi liofilizada para análises posteriores.

Os extratos obtidos de cada solvente foram submetidos a análises de cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência (Figura 9). Para a análise por CCD das frações hexânicas e de acetato de etila foram utilizados como reveladores o anisaldeído sulfúrico, o iodo e, também, luz ultravioleta de comprimento de onda curto e longo (254 nm e 365 nm). Como eluente, foi utilizada uma mistura de hexano e acetato de etila na proporção de 4:1. As frações aquosa e orgânica, obtidas pela extração em acetato de etila, foram submetidas a testes de atividade inibidora contra o próprio fungo ectomicorrízico e contra fitopatógeno.

Detectadas as frações responsáveis pelo efeito tóxico, estas foram analisadas por espectroscopia de massa, infra-vermelho e ressonância magnética nuclear a fim de identificar o composto, ou grupo de compostos, responsável por tal processo inibitório.

4.9.5.2. Testes de inibição contra fungo ectomicorrízico utilizando-se metabólitos intracelulares do próprio fungo

O fungo ectomicorrízico *Scleroderma* sp. (UFSC-Sc42) foi utilizado nesse experimento. A técnica empregada foi a do ensaio de difusão descrita no item 4.9.4.4. Primeiramente, o teste foi feito com a fração aquosa resultante da extração dos metabólitos intracelulares

(Figura 9). O extrato aquoso (57,7 mg) foi dissolvido em 700 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 50 μL desse extrato foram depositados em poços de 7 mm de diâmetro em meio de cultura sólido PGKM, com e sem carvão ativo, em placas de Petri. O experimento foi composto por quatro tratamentos: i. meio de cultura com carvão ativo e com extrato aquoso; ii. meio de cultura com carvão ativo e sem extrato aquoso; iii. meio de cultura sem carvão ativo e com extrato aquoso e iv. meio de cultura sem carvão ativo e sem extrato aquoso. Os tratamentos testemunhas (ii e iv) consistiram somente da aplicação de 50 μL de solvente DMSO nos poços, para verificar uma potencial ação tóxica do solvente frente ao fungo.

Posteriormente, 67,4 mg da fração de acetato de etila foram colocados em suspensão em 500 μL de DMSO. Para testar o efeito desta fração no crescimento do fungo, adotou-se o mesmo procedimento e os mesmos tratamentos realizados com a fração aquosa. Após 15 dias de cultivo, o diâmetro das colônias foi medido e comparado entre os diferentes tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando-se para isso o programa *Statgraphics for Windows* (Manugistics®).

4.9.5.3. Testes de inibição dos metabólitos intracelulares de fungos ectomicorrízicos contra fungo fitopatogênico e bactérias patogênicas do homem

A metodologia utilizada para o teste com o fitopatógeno, *Fusarium oxysporum*, foi idêntica àquela empregada no estudo descrito no item 4.9.5.2. Porém, utilizou-se a fração aquosa obtida da extração dos metabólitos do micélio.

Para os testes com os microrganismos patogênicos do homem, além das frações aquosas obtidas nas extrações do micélio (intracelular), foram utilizadas também a fração aquosa obtida do filtrado da cultura (extracelular) do fungo ectomicorrízico *Scleroderma* sp. (UFSC-Sc42).

Os microrganismos patogênicos ao homem foram as bactérias *Escherichia coli* (ATCC25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) e *Bacillus cereus* (ATCC 11778).

4.9.6. Acompanhamento da viabilidade de fungos ectomicorrízicos e investigação dos metabólitos intracelulares através de cromatografia de camada delgada (CCD)

Neste estudo, aplicou-se a técnica de CCD para monitorar a viabilidade do fungo *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt188) em intervalos de tempo pré-determinados, a fim de detectar o momento preciso em que o fungo perde a sua viabilidade após fragmentação.

Para isso, o fungo foi cultivado em meio líquido PGKM em frascos estáticos por 15 dias. O micélio produzido foi fragmentado em 500 mL de solução salina (NaCl 0,85 %). A suspensão obtida foi dividida em duas porções de 250 mL cada. A uma delas adicionou-se carvão ativo 0,2 %. Nesse momento, iniciou-se o monitoramento da viabilidade. Para isso, um volume de 2 mL foi retirado da suspensão e inoculado em meio de cultura sólido PGKM com carvão ativo seguido de incubação a 25 ± 1 °C durante 3 dias. Esse procedimento foi repetido após 24 e 48 horas. A Figura 10 mostra o esquema simplificado do experimento.

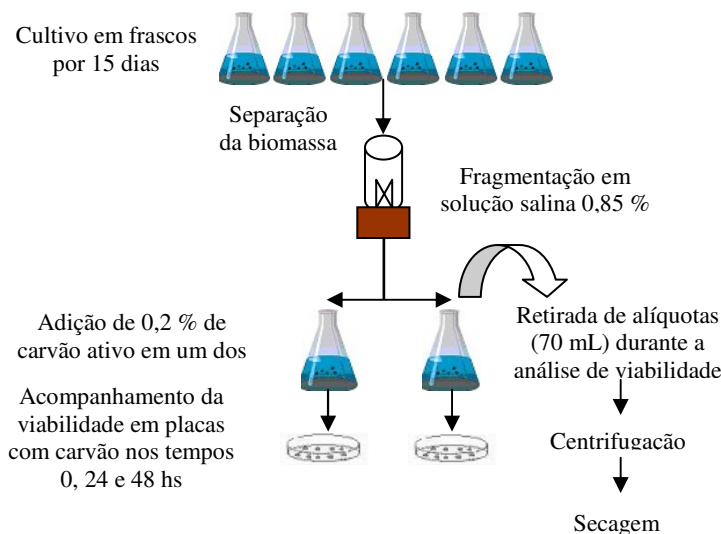


Figura 10. Esquema do experimento de monitoramento da viabilidade de fungo ectomicorrízico e investigação dos metabólitos intracelulares por CCD.

Uma alíquota de 70 mL foi centrifugada para separar o carvão e o micélio da parte líquida da suspensão. Tanto a parte líquida como o carvão e o micélio foram colocados em estufa com ventilação forçada a 50 °C até a completa eliminação da água. Após secagem, os resíduos resultantes foram solubilizados em metanol e submetidos à cromatografia em camada delgada em diferentes proporções de hexano/acetato (3:1; 4:1; 7:3) e acetato/hexano (4:1; 7:3), para determinação dos compostos presentes.

4.9.7. Instrumentalização do biorreator *airlift*

Através de recursos oriundos do CNPq, em 2008 deu-se continuidade à instrumentalização do biorreator e foi desenvolvido um sistema para o registro de informações e controle das variáveis do processo. Para isso, foi instalada uma porta lateral inclinada a 45°, na metade da altura do *riser*, para a conexão do dispositivo porta sonda Inpro® 3250/120, três portas verticais de Ø 5 mm com *O-rings* para adição de ácido, base e nutrientes, e uma porta horizontal com Ø 6 mm, na altura da interface de desgase, para a opção de operação em cultivo contínuo. A sonda para pH era do modelo Infit®761/WS da Mettler Toledo. No duto de entrada de ar, antes do umidificador e do filtro de ar, foi instalado um medidor de fluxo de massa que também atua no controle da vazão, modelo 5850S/ da Brooks® Instruments.

Após definir-se a posição dos transmissores de sinal, atuadores (fluxômetro de massa e bombas peristálticas) e da central de comandos, efetuou-se a instalação dos demais componentes eletrônicos do sistema. Os transmissores e atuadores foram ligados a um bloco conector da National Instruments (NI), modelo SC-2075 (DAQ), localizado a alguns metros de distância no quadro de controle (QC1) (Figura 11 e 12). O bloco conector foi ligado a um computador (PC) por uma placa PCI modelo 6024 da NI, que também fornece energia para o bloco. Decidiu-se por estender todo o comando elétrico dos equipamentos passando por uma chave geral no QC1 de modo a proteger o sistema sobre alta de tensão na rede elétrica. Na sequência foram instalados os cabos em calhas conduítes e efetuadas as ligações elétricas e eletrônicas aos bornes das placas e relés.

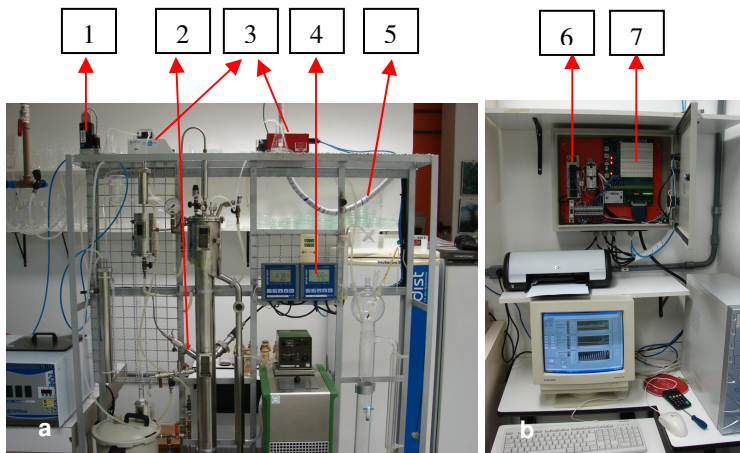


Figura 11. Panorama do Biorreator de Fermentação (BRF) (a) e da central de controle (b). (1) Fluxômetro de massa; (2) Sondas de OD e pH; (3) Bombas peristálticas; (4) Transmissores para OD e pH; (5) Cabeamento; (6) QC1; (7) Bloco conector NI SC2075.

Uma das bombas peristálticas era do tipo simples (TE-BP-01 da Tecnal Equipamentos para Laboratório Ltda.), sem a opção de saída de sinal, com o controle somente local. Devido a isso, utilizou-se uma estratégia de comando sobre a alimentação, operando-se de modo “on/off” e com a vazão estabelecida manualmente, previamente ou a qualquer momento durante o cultivo. Com o sistema montado e energizado, os próximos passos foram os testes para condicionamento dos sinais de tensão. Em alguns casos, foi necessária a troca de cabos e a instalação de filtros de linha para eliminar ruídos oriundos do cabeamento, no qual alguns cabos operavam com tensão de 220 Volts, induzindo corrente nos cabos operados com tensão de 0 a 5 Volts. O padrão definido para o sistema foi o sinal de voltagem, fazendo com que os equipamentos que emitiam sinal de corrente precisassem de conversão para emitir sinal em Volts, segundo a Lei de Ohm. Com os sinais condicionados nas tensões de operação, passou-se à programação da lógica de controle.

No microcomputador, foram instalados o *software* de programação e controle LabVIEW[®] para Windows[®] versão 8.5, e os programas e reconhecimento (*drivers*) das placas (SC-2075 e PCI-6024). Através do LabVIEW[®] foi desenvolvido um programa de Controle

(BRF.vi) que permitiu o gerenciamento do processo dentro dos parâmetros desejados, além do armazenamento dos dados a cada 3 segundos. As condições de processo foram monitoradas e puderam ser modificadas através de uma interface virtual (VI), tanto no laboratório quanto remotamente pela Internet, utilizando computador ou telefone móvel. A Figura 12 mostra o diagrama detalhado do processo e instrumentalização do biorreator (diagrama P&I). A montagem e a programação do sistema contou com os serviços de um profissional instrumentista da empresa Real Automação Ltda.

Um cultivo preliminar com bactérias do gênero *Bacillus* foi realizado em condições não assépticas, de modo a ter liberdade para manipular os instrumentos e soluções conforme a necessidade de efetuar ajustes e calibrações. Após a etapa de ajustes, o biorreator foi preparado para um cultivo fúngico em condições assépticas, conforme descrito a seguir.

4.9.7.1. Estudo cinético do crescimento do fECM *Rhizopogon nigrescens* (UFSC-Rh90) durante cultivo controlado em biorreator *airlift*

O isolado fúngico UFSC-Rh90 foi cultivado em meio de cultura líquido PGKM, em biorreator *airlift*, nas condições descritas no item 4.4, sob leve pressão interna (resultante da perda de carga no filtro de ar de saída). As soluções de NaOH e HCl (800 mL a 0,5 M para cada solução) utilizadas para controlar o pH foram previamente esterilizadas em autoclave e seus recipientes conectados ao biorreator no momento de sua esterilização para que se efetuasse também, a esterilização das conexões.

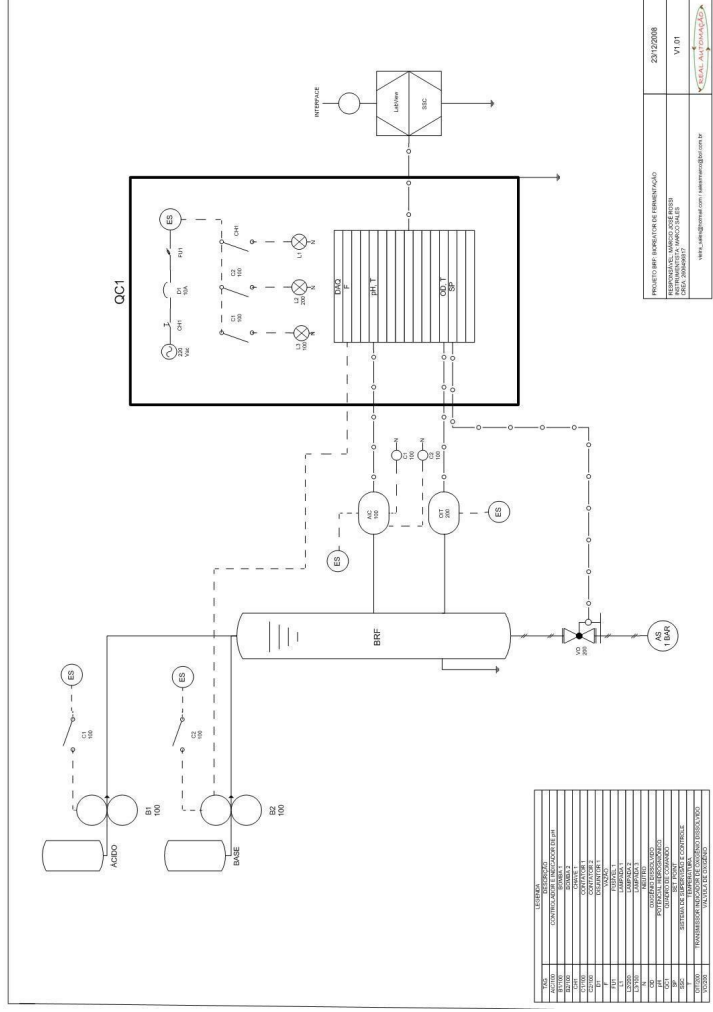


Figura 12. Diagrama de processo e instrumentalização do biorreator (diagrama P&I).

Após a transferência do meio de cultura para o biorreator, passou-se a aerar o meio até a saturação, o que ocorreu em 20 minutos (ROSSI, 2006). Após a saturação do meio, o sinal de corrente no sensor de oxigênio foi calibrado em 100 %. O sensor de pH foi calibrado antes da esterilização do biorreator, com soluções padrão de pH 4,0 e 7,0. O programa de controle (BRF.vi) foi iniciado e as entradas de sinais de tensão em Volts, provenientes dos sensores de T, pH, OD e vazão de ar, foram configuradas com os parâmetros de calibração previamente determinados, para fornecer os valores em °C, $\log[H^+]$, % SAT e vvm. Estabeleceu-se um valor de 40 % para o “préset” da válvula de ar (abertura mínima do fluxômetro de massa) para que a vazão de ar correspondente proporcionasse uma mistura adequada ao meio de cultivo, uniformizando a concentração hidrogeniônica e a temperatura. Também foi estabelecida uma concentração de OD mínima de 60 % da saturação ($4,5 \text{ mg.L}^{-1}$) (ROSSI, 2006) como concentração crítica, a partir da qual o sistema deveria operar fornecendo maior vazão de ar ao cultivo.

Em seguida, as bombas peristálticas foram ligadas e reguladas para 4 rpm e o programa BRF.vi passou a ser executado continuamente, para controle e registro do processo, cujas informações ficaram registradas num arquivo de dados (20 registros por minuto). Nesse momento, uma amostra inicial do cultivo (40 mL) foi retirada para determinação de X_0 , sendo as demais amostras retiradas periodicamente a intervalos de tempo diferentes, de acordo com o progresso do cultivo, e congeladas a -20 °C para posterior análise. Ocasionalmente, uma amostra foi retirada assepticamente para o controle microbiológico da pureza da cultura.

As amostras foram utilizadas para as determinações analíticas de glicose residual, concentração de biomassa e coloração do meio de cultura (por espectrofotometria a 465 nm em pH 7,6 – item 4.7.5). O cultivo foi conduzido até o consumo total da glicose, propiciando alto rendimento.

5. Resultados e Discussão

5.1. Monitoramento da viabilidade

5.1.1. Influência do carvão ativo na manutenção da viabilidade de fungos ectomicorrízicos

A fragmentação do micélio fúngico é uma etapa inerente aos processos de cultivo de fungos ectomicorrízicos, seja para inoculação do biorreator, no início ao processo de cultivo em larga-escala, seja posteriormente para produção de cápsulas de inoculante. Após a fragmentação, a manutenção ou até mesmo a expressão da viabilidade fúngica torna-se um entrave para as etapas seguintes.

O período de 2 a 3 dias para confirmação da viabilidade da suspensão miceliana em meio sólido é uma etapa crítica, pois a incerteza quanto à viabilidade do fungo pode comprometer o planejamento e o processo como um todo. Isso se deve ao fato de que, após a fragmentação do micélio, substâncias intracelulares são liberadas (enzimas, lipídios, proteínas, entre outros) e podem reagir entre si, produzindo compostos inibitórios ao próprio fungo, o que o impede de expressar sua viabilidade (LAPEYRIE e BRUCHET, 1985).

Além disso, a toxicidade desses compostos é intensificada ao longo do tempo. Sendo assim, decorridos 2 a 3 dias, período necessário para confirmar a viabilidade de uma suspensão miceliana, é provável que a qualidade dessa suspensão não seja a mesma do dia em que foi inicializado o teste de viabilidade. Esse fato pode afetar o processo, diminuindo a produção de biomassa ou a viabilidade das cápsulas, quando o objetivo é a produção de inoculantes.

A utilização de carvão ativo nas suspensões micelianas, logo após a sua fragmentação, tem proporcionado melhores resultados no que tange à manutenção da viabilidade. Segundo Rossi (2006), mesmo suspensões micelianas adicionadas de carvão ativo, armazenadas por períodos maiores de tempo sob refrigeração conseguiram manter sua viabilidade.

Contudo, a perda de viabilidade após fragmentação depende do isolado fúngico envolvido. No caso do isolado UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*) (Figura 17), a viabilidade parece ser pouco afetada pela presença ou ausência do carvão ativo no meio de cultura. Na Figura 13 pode-se observar que no momento da fragmentação (tempo

zero) independentemente da adição ou não de carvão ativo à suspensão, o fungo consegue expressar perfeitamente sua viabilidade. Contudo, esse isolado é o que apresenta menos problemas quanto à auto-inibição. Já para os outros isolados, a manifestação da viabilidade após fragmentação, depende da presença de carvão ativo na suspensão.

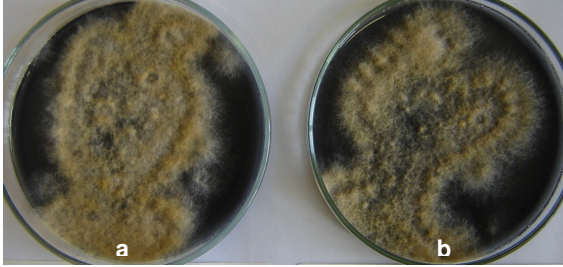


Figura 13. Viabilidade de uma suspensão miceliana do isolado UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*), inoculada imediatamente após a fragmentação, em meio de cultura PGKM sólido: (a) suspensão sem carvão ativo; (b) suspensão com carvão ativo.

Este é o caso do fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt188). Quando se compara a retomada de crescimento de uma suspensão miceliana desse fungo após fragmentação em meio com carvão ativo e sem carvão, percebe-se claramente a influência desse composto na manifestação da viabilidade (Figura 14).

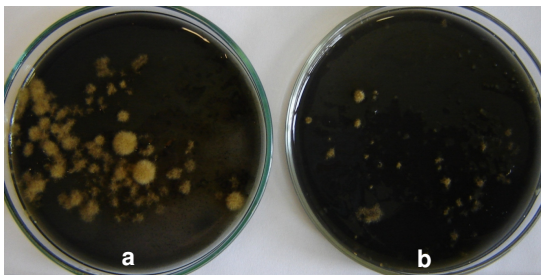


Figura 14. Viabilidade de uma suspensão do isolado UFSC-Pt188 (*Pisolithus microcarpus*) inoculada imediatamente após a fragmentação, em meio de cultura PGKM sólido: (a) suspensão com carvão ativo; (b) suspensão sem carvão ativo.

Assim, para o isolado UFSC-Pt188 (Figura 14), mesmo no momento da fragmentação, os problemas de viabilidade são maiores que para o UFSC-Rh90. Além disso, a viabilidade é afetada mesmo no meio de cultura com carvão ativo. Sendo assim, é imprescindível que o micélio seja tratado com carvão ativo para que o fungo consiga manifestar mais facilmente sua viabilidade.

Além disso, a presença ou ausência de carvão ativo no meio onde a viabilidade é testada também influencia esse parâmetro. Resultados obtidos por Rossi (2006) mostraram que suspensões micelianas do isolado UFSC-Pt116, armazenadas por mais de 30 dias com carvão ativo, expressaram maior viabilidade quando testadas em meio sólido com carvão do que em meio sem carvão. Esse mesmo fenômeno foi observado com o fungo *Chondrogaster angustiporus* (isolado UFSC-Ch163) (ROSSI, 2006).

5.1.2. Influência da adição de ácido ascórbico na manutenção da viabilidade de fungos ectomicorrízicos

Outra hipótese a considerar, para explicar a inibição do crescimento pelos metabólitos produzidos pelo próprio fungo, seria a de que esses metabólitos tóxicos podem estar sendo formados durante o tempo de repouso/armazenamento e não no momento da fragmentação. Com base nessa hipótese, associou-se a perda de viabilidade do fungo a um processo oxidativo de uma determinada substância ou grupo de compostos liberados pelas células. Estas, quando liberadas, entrariam em contato com o oxigênio e oxidar-se-iam, tornando o meio inadequado para que o fungo manifestasse sua viabilidade após fragmentação.

Esse experimento apresentou alguns problemas iniciais, pois a adição de ácido ascórbico à suspensão miceliana, na mesma proporção em que vinha sendo adicionado o carvão ativo (0,2 %), alterou significativamente o pH desta. O pH da solução salina contendo somente micélio ficava em torno de 5,58 e o da solução salina contendo micélio e carvão ativo ficava em 6,45. Já o pH da suspensão miceliana com ácido ascórbico baixava para 3,15, o que inviabilizava a suspensão miceliana.

O ácido ascórbico é muito utilizado para evitar a oxidação dos tecidos de plantas em procedimentos de micropropagação (UTINO *et al.*, 2001). A concentração usada nesses casos varia de 10 a 200 mg.L⁻¹. Visando-se reduzir a acidificação da suspensão miceliana, estabeleceu-

se a concentração de 120 mg.L^{-1} em substituição à concentração que vinha sendo utilizada, que correspondia a 300 mg.L^{-1} de ácido ascórbico.

Os resultados aqui apresentados referem-se ao fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt116). A Figura 15 mostra a influência do carvão ativo e do ácido ascórbico na viabilidade do micélio em suspensões micelianas desse isolado.

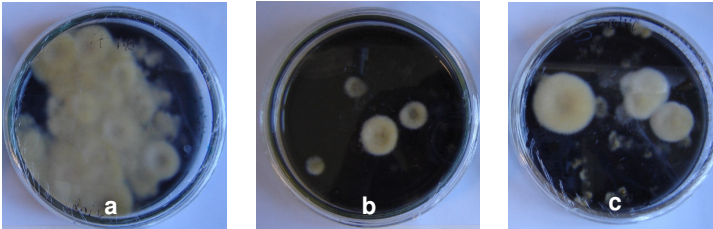


Figura 15. Viabilidade inicial de suspensões micelianas do isolado UFSC-Pt116 (*Pisolithus microcarpus*), submetidas a diferentes tratamentos e inoculadas em meio de cultura PGKM sólido com carvão ativo. (a) suspensão tratada com 0,2 % de carvão; (b) suspensão tratada com 120 mg.L^{-1} de ácido ascórbico; (c) suspensão miceliana sem aditivos.

Na suspensão com carvão ativo, a viabilidade manifestou-se mais intensamente que nos demais tratamentos. Mesmo na suspensão sem adição de carvão ativo e ácido ascórbico, o fungo apresentou viabilidade, embora, neste caso tenha se mostrado inferior à suspensão com carvão. Na suspensão tratada com ácido ascórbico, a viabilidade foi a menor dos três tratamentos.

Entretanto, 48 horas após a fragmentação (Figura 16), a suspensão que foi tratada com ácido ascórbico apresentou viabilidade mais intensa que a suspensão sem tratamento. Mas a suspensão tratada com carvão ainda manteve viabilidade superior às demais.

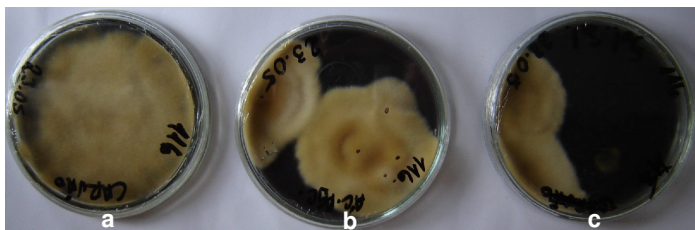


Figura 16. Viabilidade, após 48 horas da fragmentação, de suspensões micelianas do isolado UFSC-Pt116 (*Pisolithus microcarpus*), submetidas a diferentes tratamentos e inoculadas em meio de cultura PGKM sólido com carvão: (a) suspensão tratada com 0,2 % de carvão; (b) suspensão tratada com 120 mg.L^{-1} de ácido ascórbico; (c) suspensão miceliana sem aditivos.

A viabilidade ainda foi acompanhada até 7 dias após a fragmentação. Nesse momento, somente a suspensão tratada com carvão manifestou viabilidade (Figura 17).

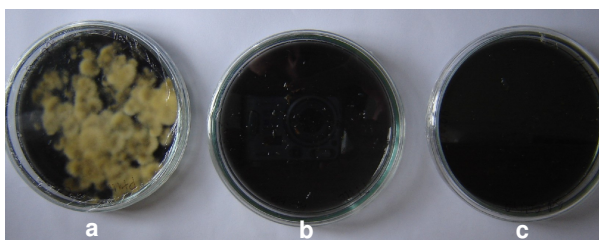


Figura 17. Viabilidade, 7 dias após a fragmentação, de suspensões micelianas do isolado UFSC-Pt116 (*Pisolithus microcarpus*), submetidas a diferentes tratamentos e inoculadas em meio de cultura PGKM sólido com carvão ativos: (a) suspensão tratada com 0,2 % de carvão; (b) suspensão tratada com 120 mg.L^{-1} de ácido ascórbico; (c) suspensão miceliana sem aditivos.

Como o ácido ascórbico tem reconhecida ação anti-oxidante, o fato de sua adição à suspensão miceliana não ter contribuído para a manutenção da viabilidade sugere que o fenômeno de perda de viabili-

dade não está relacionado ao processo oxidativo dos metabólitos liberados durante a fragmentação. Mas é também possível que a concentração de ácido ascórbico não tenha sido adequada para esse caso, já que sua escolha foi baseada em estudos com tecidos vegetais, cuja reação pode diferir bastante da reação de uma suspensão fúngica.

Mesmo que o processo de auto-inibição não esteja relacionado a um processo oxidativo, verificou-se que o ácido ascórbico reduziu a oxidação dos compostos presentes na suspensão miceliana. Isto pode ser notado quando se comparou a coloração da suspensão tratada com ácido ascórbico com a coloração da suspensão sem esse ácido (Figura 18), verificou-se uma diferença significativa na intensidade de pigmentação, com a primeira apresentando coloração mais clara que a segunda. Não se pode descartar, porém, a possibilidade de essas diferenças na coloração possam ter sido causadas pelo pH das diferentes suspensões.

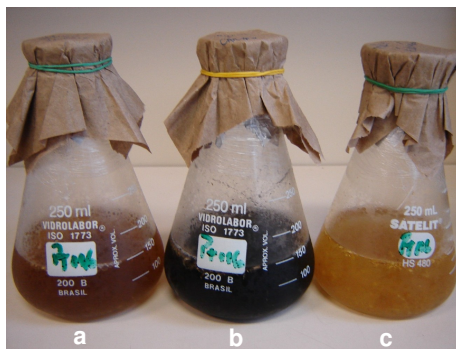


Figura 18. Influência da adição de ácido ascórbico na coloração de suspensões micelianas do isolado UFSC-Pt116 (*Pisolithus microcarpus*), logo após a fragmentação: (a) em ausência de ácido ascórbico; (b) em presença de carvão ativo; (c) com ácido ascórbico.

5.1.3. Influência da presença de oxigênio na manutenção da viabilidade de fungos ectomicorrízicos

Mesmo com a ausência de oxigênio, a viabilidade do isolado UFSC-Pt188 não foi mantida, sendo expressa somente em presença de carvão ativo. Contudo, ao final do experimento, os frascos contendo a suspensão miceliana tratada ou não com nitrogênio foram abertos para

uma análise visual com relação à cor e ao odor. Todos os tratamentos apresentaram cor tendendo ao marrom escuro, sem diferenças visuais na coloração entre eles (Figura 19). Já no que tange ao odor, a suspensão com oxigênio, apresentou odor característico de processo de rancificação, enquanto que a suspensão sem oxigênio apresentou odor característico do próprio fungo.

Sabe-se que os fungos ectomicorrízicos apresentam no interior do seu micélio ácidos graxos e estes parecem ter sido oxidados pela exposição ao oxigênio. Estudos desenvolvidos por Martin *et al.* (1984) verificaram a presença de ácidos graxos no interior do micélio dos fECM *Cenococcum graniforme* e *Hebeloma crustuliniforme* através da técnica de RMN. Imagina-se então, que durante o processo de fragmentação do micélio o conteúdo de ácidos graxos é liberado para a suspensão e estes, em contato com o oxigênio, iniciam um processo de autooxidação, o qual leva à formação de uma série de produtos secundários.

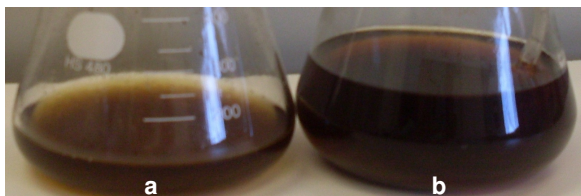


Figura 19. Coloração das suspensões micelianas do isolado UFSC-Pt188: (a) sem tratamento com nitrogênio; (b) com tratamento.

5.2. Manutenção do pH do meio de cultura: influência na produção de biomassa de fungos ectomicorrízicos em meio líquido

A Figura 20 mostra os valores de biomassa e variação de pH em módulo (ΔpH) do meio de cultura ao final de 15 dias de cultivo do fungo *Scleroderma* sp. (isolado UFSC-Sc42), em frascos estáticos. Já, a Figura 21 mostra os valores dos mesmos parâmetros ao final de 24 dias de cultivo do fungo *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt188), também cultivado em frascos estáticos.

Para o estudo utilizando o isolado UFSC-Sc42, nos níveis +1 de citrato de sódio (60 mL.L^{-1}) e +1 de succinato de sódio (40 mL.L^{-1}), obteve-se a

menor variação em módulo de pH (0,72). Já para o isolado UFSC-Pt188, a menor variação em módulo de pH (0,35) foi obtida com os níveis 0 de citrato de sódio (50 mL.L^{-1}) e +1,41 de succinato de sódio ($44,1 \text{ mL.L}^{-1}$). Entretanto, esta menor variação obtida nesses níveis não resultou em maior rendimento de biomassa para os isolados. Para o isolado UFSC-Sc42, a biomassa obtida nesse ensaio foi de $1,91 \text{ g.L}^{-1}$, e para o isolado UFSC-Pt188, $1,10 \text{ g.L}^{-1}$.

O maior valor de biomassa obtido para o isolado UFSC-Sc42 foi de $6,76 \text{ g.L}^{-1}$, o que ocorreu no ensaio 2, onde utilizaram-se os níveis -1 de citrato de sódio (40 mL.L^{-1}) e +1 de succinato de sódio (40 mL.L^{-1}). A variação em módulo de pH nesse ensaio foi de 1,02. Já para o isolado UFSC-Pt188, o maior valor obtido foi no tratamento controle ($3,47 \text{ g.L}^{-1}$), sem adição de solução tampão. Nesse nível, observou-se a maior variação em módulo de pH, que foi de 2,14. Sendo assim, pode-se afirmar que o aumento da biomassa foi acompanhado de decréscimo do pH do meio de cultura para o isolado UFSC-Pt188, com uma forte correlação ($R^2 = 0,90$) entre essas variáveis. Para o isolado UFSC-Sc-42, a correlação entre essas variáveis foi praticamente nula, onde o maior valor de biomassa foi obtida para uma variação de pH que corresponde à metade do valor obtido pelo isolado UFSC-Pt188. A Figura 22 mostra o gráfico de correlação da variação em módulo de pH com o valor de biomassa obtido para cada isolado fúngico.

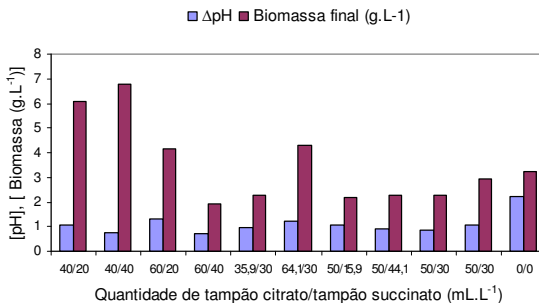


Figura 20. Variação em módulo de pH e concentração de biomassa ao final de 15 dias de cultivo em frascos estáticos do isolado UFSC-Sc42 (*Scleroderma* sp).

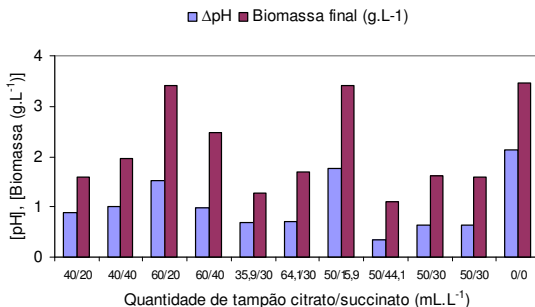


Figura 21. Variação em módulo de pH e da concentração de biomassa ao final de 24 dias de cultivo em frascos estáticos do isolado UFSC-Pt188 (*Pisolithus microcarpus*).

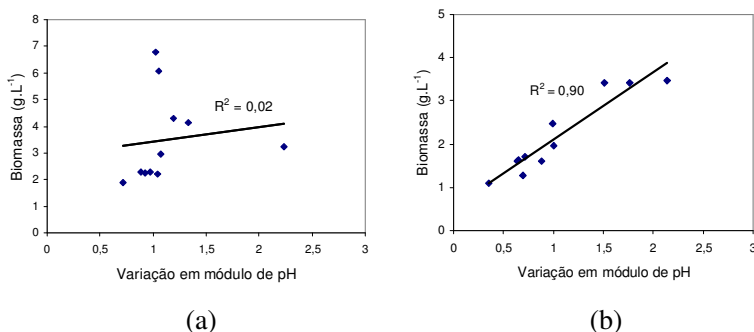


Figura 22 Correlação da variação de pH em módulo com a biomassa para os isolados fúngicos UFSC-Sc42 (a) e UFSC Pt188 (b).

De acordo com Hung e Trappe, (1983), muitos fungos ectomicorrízicos apresentam características acidófilas. No entanto, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o fungo *Scleroderma* sp. (isolado UFSC-Sc42) apresenta características acidófilas menos pronunciadas que o fungo *Pisolithus microcarpus*, pelo fato de o maior valor de biomassa estar acompanhado de uma menor variação de pH. Fungos do gênero *Pisolithus* são conhecidos colonizadores de plantas em solos ácidos ou acidificados por atividades antrópicas (MARX, 1991). Assim, é compreensível que o isolado UFSC-Pt188, apresente maior resistência à redução do pH do meio.

Através do gráfico de Pareto (Figura 23a), pode-se observar que para o isolado UFSC-Sc42, nenhum termo apresentou efeito significativo ($p \leq 0,05$). Nesse gráfico, apresenta-se a contribuição de cada variável na resposta biomassa, bem como o valor de cada efeito estimado para o planejamento. Através da análise estatística (Anexo 1), verificou-se que o modelo proposto não foi adequado, pois apresentou erro experimental elevado e coeficiente de determinação (R^2) de apenas 0,27. Seria então necessário outro modelo, ou até mesmo verificar a qualidade dos dados obtidos. Entretanto, no que diz respeito à manutenção do pH, todos os tampões testados apresentaram capacidade tamponante do meio de cultura, quando comparados ao tratamento testemunha.

Em estudo anterior, Rossi (2006) observou que todos os ensaios que utilizaram diferentes concentrações das soluções tampões apresentaram melhor capacidade tamponante do meio de cultura quando comparados ao tratamento testemunha, sem o tampão. Verificou, também, que os melhores resultados foram obtidos utilizando-se o tampão citrato de sódio em cultivos dos isolados UFSC-Sc42 e UFSC-Pt188. Para o isolado UFSC-Pt188, somente o termo quadrático da variável citrato de sódio não apresentou efeito significativo. Os termos citrato (L) e succinato (Q) influenciaram positivamente a resposta biomassa, enquanto que os termos succinato (L) e a interação citrato-succinato, negativamente (Figura 23b). Nesse experimento, o coeficiente de determinação, apesar de não ter proporcionado um bom ajuste ($R^2 = 0,71$), foi melhor que o obtido com o isolado UFSC-Sc42.

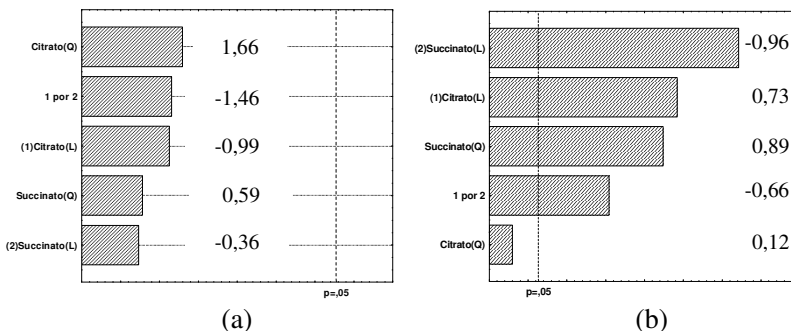


Figura 23. Gráfico de Pareto para os efeitos estimados na resposta biomassa para os isolados de fungos ectomicorrízicos: (a) UFSC-Sc42; (b) UFSC-Pt188.

O mesmo procedimento de análise estatística foi aplicado para a resposta variação de pH (Anexo 2). No gráfico de Pareto (Figura 24a), observa-se que para o isolado UFSC-Sc42 nenhuma das variáveis apresentou efeito significativo na resposta variação de pH. Tanto o succinato de sódio como o citrato de sódio apresentaram boa capacidade de tamponamento. Isto provavelmente se deve ao fato de os valores das constantes de dissociação dos ácidos (pKa) formadores das soluções tampão (ácido cítrico, pKa = 4,8 e ácido succínico, pKa = 5,6) serem próximos do valor de pH apropriado (5,8) para o cultivo do isolado UFSC-Sc42. Assim sendo, quanto maior a quantidade de uma solução tampão em relação à outra, maior será a capacidade de tamponamento da solução, e mais próxima do pKa do ácido que compõe a mesma. Em vista do exposto, a conjugação desses dois tampões não apresentou efeito significativo na variação de pH. No entanto, como mencionado anteriormente, comparando-se com o tratamento testemunha, todos apresentaram efeito tamponante. Para este isolado, o coeficiente de determinação obtido ($R^2 = 0,70$) foi marcadamente melhor que o obtido para a resposta biomassa.

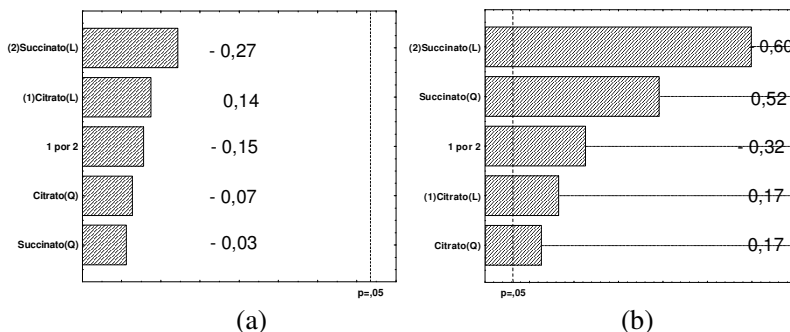


Figura 24. Gráfico de Pareto para os efeitos estimados na resposta variação de pH para os isolados de fungos ectomicorrízicos: (a) UFSC-Sc42; (b) UFSC-Pt188.

Contudo, para o isolado UFSC-Pt188, observou-se comportamento diferente e, neste caso, todas as variáveis testadas influenciaram significativamente a reposta variação de pH (Figura 24b). Como comentado anteriormente, pelo fato de este fungo apresentar maior capa-

cidade de acidificar o meio que o isolado UFSC-Sc42, a adição de tampão influenciou marcadamente na resposta variação de pH. O coeficiente de determinação obtido para essa análise foi de 0,72.

Independentemente da falta de ajuste do modelo proposto para o experimento com o isolado UFSC-Sc42, realizou-se um cultivo em biorreator, onde a região de trabalho escolhida para a adição das soluções tampões foi alicerçada na melhor resposta de biomassa obtida ($6,76 \text{ g.L}^{-1}$). Dessa forma, os níveis -1 de citrato de sódio (40 mL.L^{-1}) e +1 de succinato de sódio (40 mL.L^{-1}) foram utilizados na formulação dos 5 L de meio de cultura para inoculação do biorreator.

A Figura 25 mostra a produção de biomassa e variação de pH durante o cultivo de *Scleroderma* sp. (UFSC-Sc42) em biorreator *airlift*, utilizando-se a proporção de soluções tampão definida pelo planejamento anteriormente descrito.

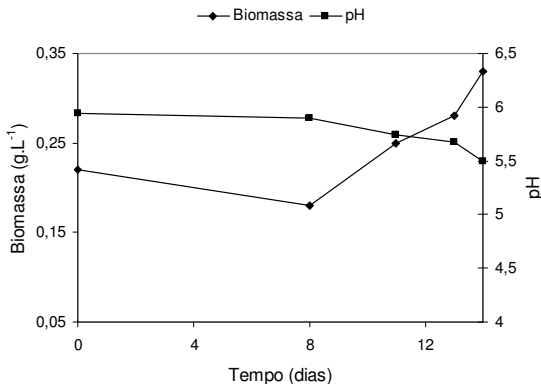


Figura 25. Produção de biomassa e variação de pH durante o cultivo em biorreator *airlift* de *Scleroderma* sp. (UFSC-Sc42), em meio de cultura PGKM.

A produção de biomassa nos cultivos em frascos estáticos foi de $6,76 \text{ g.L}^{-1}$, enquanto que no biorreator ela foi muito baixa, com apenas $0,33 \text{ g.L}^{-1}$, o que representava um pouco mais do que foi introduzido com o próprio inóculo ($0,22 \text{ g.L}^{-1}$). Além disso, a velocidade específica média de crescimento foi apenas $0,1 \text{ dia}^{-1}$.

As características ambientais nos dois tipos de cultivos são muito diferentes para que se possam tecer comparações objetivas. Entretanto,

alguns detalhes podem ser considerados como tendo contribuído para essas diferenças. Um deles diz respeito à questão da fragmentação do micélio para inoculação do biorreator. Tal procedimento pode ter comprometido a viabilidade do micélio, pois com o rompimento das hifas, enzimas e outros metabólitos são liberados para o meio e podem reagir entre si e produzir compostos tóxicos que reduzem o crescimento do próprio fungo (LAPEYRIE e BRUCHET, 1985). Já na inoculação dos frascos para o cultivo estático não foi feita a fragmentação e foram usados discos de meio coberto de micélio, previamente testados quanto à viabilidade.

Uma alternativa que já vinha sendo testada para diminuir a toxicidade dos metabólitos liberados durante a fragmentação foi a incorporação de 0,2 % carvão ativo no momento da fragmentação, que poderia levar à adsorção desses compostos. No entanto, para o isolado UFSC-Sc42, nem mesmo a presença de carvão conseguiu atenuar o efeito inibidor. Sabe-se, porém, que nem todos os isolados apresentam essa inibição após fragmentação do micélio. Cultivos realizados com o fungo *Rhizopogon nigrescens* (isolado UFSC-Rh90) apresentaram valores de biomassa superiores a 6 g.L⁻¹ e velocidade específica média de crescimento de 0,62 dia⁻¹ (ROSSI, 2006).

5.3. Influência do carvão ativo no crescimento de fungos ectomicorrízicos em meio líquido

A Figura 26 mostra os valores médios de biomassa, pH e $Y_{X/S}$ obtidos ao final de 22 dias de cultivo em meio líquido PGKM com e sem carvão ativo dos isolados de FECM UFSC-Rh90, UFSC-Sc42, UFSC-Pt188 e UFSC-Pt116.

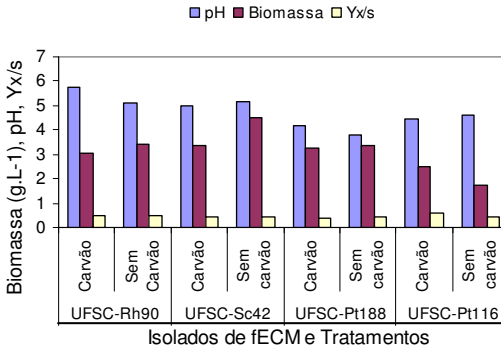


Figura 26. Valores médios de biomassa, pH e $Y_{x/s}$ obtidos ao final de 22 dias de cultivo em meio líquido PGKM com e sem carvão ativo dos isolados de fECM UFSC-Rh90, UFSC-Sc42, UFSC-Pt188 e UFSC-Pt116.

Para os isolados UFSC-Rh90 e UFSC-Pt188, o valor médio do pH ao final do cultivo foi ligeiramente maior no meio com carvão ativo. Já para os isolados UFSC-Sc42 e UFSC-Pt116, o pH foi maior no meio sem carvão.

Com relação aos valores de biomassa, com exceção do isolado UFSC-Pt116, todos apresentaram melhores resultados no meio de cultura sem carvão ativo. Pode-se afirmar que o carvão ativo, para esses isolados, não promove o aumento de biomassa, embora aumente a viabilidade do micélio fragmentado.

Percebe-se assim que o carvão, embora seja de fundamental importância para manutenção da viabilidade (número de propágulos ativos) dos fECM, não proporciona maior produtividade. Esse produto contribui para evitar a morte das hifas e, como consequência, aumenta a viabilidade dos propágulos em relação a uma suspensão sem carvão, além de adsorver os metabólitos gerados pela fragmentação do micélio. Por outro lado, quando colocado no meio de cultivo, o carvão pode adsorver nutrientes e competir com o fungo, o que pode levar a uma redução na velocidade de crescimento. Isso pode ser comprovado quando se compararam os valores de biomassa obtidos no cultivo dos fECM em meio líquido com e sem carvão ativo.

5.4. Detecção de metabólitos tóxicos extracelulares e a influência do carvão ativo na adsorção desses compostos

5.4.1. Produção de metabólitos inibidores não voláteis

A comparação entre o diâmetro de crescimento ao final da primeira etapa de cultivo (cultivo sobre celofane durante 15 dias) e os da segunda etapa (cultivo de 15 dias diretamente sobre o meio após a retirada do papel celofane), para os fungos *Scleroderma* sp. (UFSC-Sc42) e *Rhizopogon nigrescens* (UFSC-Rh90), mostrou que, individualmente, todos os fatores testados (carvão, isolado e etapa) apresentaram influência significativa sobre o diâmetro da colônia. Não houve efeito significativo das interações de 2ª ordem entre os fatores isolado x meio, isolado x etapa, e meio x etapa. No entanto, como a interação de 3ª ordem, envolvendo isolado, meio de cultura e etapa do cultivo também teve efeito significativo nessa resposta, desprezaram-se os efeitos individuais e as interações de 2ª ordem e procedeu-se à análise dessa interação. O anexo 3 apresenta a análise de variância desses dados.

A Figura 27 mostra a variação das médias de diâmetro da colônia para interação entre isolado, meio de cultura e etapa do cultivo. Observou-se que na primeira etapa (15 dias) o isolado que apresentou maior resposta da primeira para a segunda etapa foi o UFSC-Rh90, crescendo em meio de cultura PGKM sem carvão, obtendo um diâmetro médio de 5,5 cm. O isolado UFSC-Sc42 apresentou diâmetro inferior, com valor médio de 3,92 cm, em meio sem carvão.

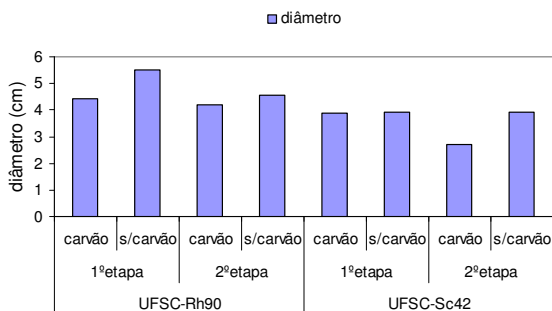


Figura 27. Gráfico das médias para a interação entre isolado, meio de cultura e etapa do cultivo.

Na segunda etapa do cultivo (mais 15 dias), com novo disco de micélio inoculado ao meio, o isolado UFSC-Rh90 apresentou maior crescimento em meio sem carvão, como observado na primeira etapa, porém, com menor diâmetro de colônia (4,56 cm) em relação à primeira etapa. Para o isolado UFSC-Sc42, houve maior diferença entre o diâmetro do cultivo com e sem carvão. Para esses dois isolados, pode-se afirmar que, no que diz respeito ao aumento de biomassa, a adição de carvão não apresentou influência positiva.

Pelos valores de diâmetros obtidos ao final da segunda etapa, não foi observada inibição do crescimento dos isolados UFSC-Rh90 e UFSC-Sc42. Entretanto, houve diferença significativa entre os valores de diâmetro na segunda da etapa em relação aos da primeira. Embora esse efeito possa estar relacionado com a diminuição da concentração de nutrientes no meio com o aumento do tempo de cultivo, deve-se ressaltar que a formação de metabólitos secundários tóxicos ocorre, principalmente, durante a fase estacionária de crescimento, onde a concentração do substrato atinge valores que limitam o crescimento. Tal fenômeno favorece o uso de vias metabólicas alternativas, com a conseqüente formação de produtos que podem ter efeito inibitório no crescimento (ARORA, *et al*, 1992). Portanto, deve-se proceder à mesma metodologia utilizando-se períodos mais longos de cultivo.

A Figura 28 mostra os isolados UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*) e o UFSC-Sc42 (*Scleroderma* sp.) após 15 dias de cultivo em meio sólido sem carvão ativo sobre o papel celofane.

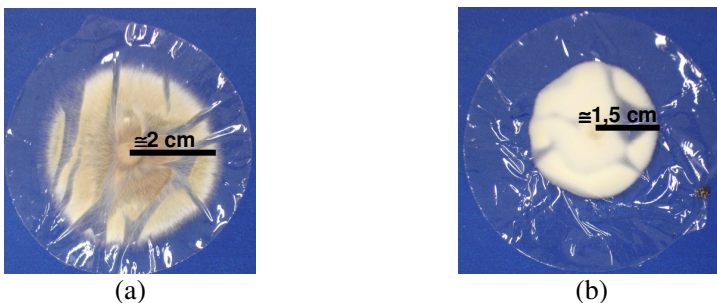


Figura 28. Aspecto e tamanho da colônia dos isolados (a) UFSC-Rh90 e (b) UFSC-Sc42, aos 15 dias em meio de cultura sólido sem carvão ativo, sobre papel celofane.

O isolado UFSC-Rh90 apresentou um crescimento mais acentuado em meio sólido do que o isolado UFSC-Sc42, uma característica inerente ao isolado. Esse fungo cresce bem tanto em meio sólido em placa, quanto em meio líquido em biorreator, apresentando alta viabilidade. Quando cultivado em meio líquido, o pH final não sofre fortes alterações. Tais resultados podem ser devido à baixa produção de metabólitos tóxicos ou, até mesmo, à sua alta resistência aos metabólitos formados durante seu próprio crescimento.

5.4.2. Efeito de filtrado de cultura de fungo ectomicorrízico no crescimento do fungo produtor e de fungo fitopatogênico

Verificou-se que a adição de diferentes concentrações de filtrado fúngico em meio sólido não influenciou significativamente a resposta diâmetro da colônia para o isolado UFSC-Pt188 (*Pisolithus microcarpus*). Além disso, não houve interação significativa entre a concentração de filtrado fúngico e a presença ou ausência de carvão ativo, no diâmetro da colônia. Sendo assim, pode-se afirmar que os metabólitos secretados para o meio de cultura líquido não apresentaram toxicidade sobre próprio fungo quando incorporados ao meio de cultura sólido.

Rossi (2006) encontrou compostos fenólicos de alto peso molecular em filtrados de cultura desse isolado, tanto na presença quanto na ausência de carvão ativo. Isso parece indicar que o fungo libera os compostos fenólicos na forma polimerizada, o que evitaria sua toxicidade. Se este for o caso, esta é mais uma evidência de que a perda de viabilidade ocorrida após fragmentação do micélio poderia ser causada pela liberação de compostos fenólicos de baixo peso molecular que são considerados como os de maior ação antifúngica.

A Figura 29 mostra o crescimento do fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt188) nas diferentes concentrações de filtrado (0, 5, 10 e 15 %) em meio de cultura sólido com carvão ativo e sem carvão ativo.

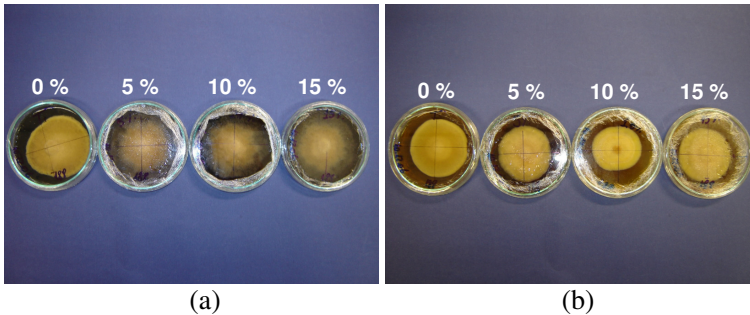


Figura 29. Crescimento do fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt188) em meio sólido contendo filtrado fúngico nas concentrações de 0, 5, 10 e 15 %: (a) com carvão ativo e (b) sem carvão ativo.

Observou-se um efeito significativo da variável carvão ativo no diâmetro da colônia. Contrariamente ao que foi observado para os isolados UFSC-Rh90 e UFSC-Sc42 (item 5.4.1), o carvão ativo contribuiu para o aumento do crescimento em meio sólido. O diâmetro médio obtido em meio sólido com carvão foi 4,4 cm, enquanto que para o meio sem carvão foi 3,4 cm. Os resultados dessa análise de variância podem ser vistos no Anexo 4.

Para esse isolado, ficou evidente a influência positiva da presença de carvão ativo no meio de cultura sólido no diâmetro da colônia. Porém, um maior diâmetro de colônia, não necessariamente reflete maior biomassa. Para conclusões mais precisas sobre o efeito de um fator no crescimento fúngico, é necessário medir a biomassa e, isso só poderia ser feito com precisão em estudos em meio líquido. De fato, quando esse isolado foi cultivado em meio líquido, verificou-se que não houve diferença na produção de biomassa entre o tratamento com carvão e o tratamento sem carvão (item 5.3.).

Para o fitopatógeno *Fusarium oxysporum* não foi observada inibição pela adição de filtrado de cultura (Figura 30). Este fungo, por apresentar velocidade de crescimento bem superior à do fungo ectomicorrízico, cobriu toda a superfície do meio de cultura nas placas em poucos dias de cultivo, o que inviabilizou a detecção de uma eventual inibição. Isso ocorreu independentemente da concentração de filtrado fúngico, bem como da adição ou não de carvão ativo ao meio de cultura. Suh *et al.* (1991) observaram atividade antifúngica de filtrado de cultura do fECM *Pisolithus tinctorius* ao meio de cultura sobre vários fungos:

Fusarium solani, *Phanerochaete chrysosporium*, *Geotrichum candidum* e *Verticillium dahliae*. Kope e Fortin (1989), ao testar atividade inibidora do filtrado de cultura de diversos fECM em relação a vários fitopatógenos, observaram que o filtrado de isolado de *Pisolithus tinctorius* apresentou o maior espectro de ação. Um pigmento escuro produzido por esse isolado, que se difundia no meio e atingia as hifas dos fitopatógenos, parece ter sido a causa da inibição. Os fungos estudados, assim como a técnica empregada por esse autores, foram, porém, diferentes do empregado no presente estudo. Pode-se, portanto, sugerir que a produção de compostos antifúngicos por fECM depende da espécie estudada, bem como da composição do meio de cultura (SASEK e MUSILEK, 1967; KOPE e FORTIN, 1989).

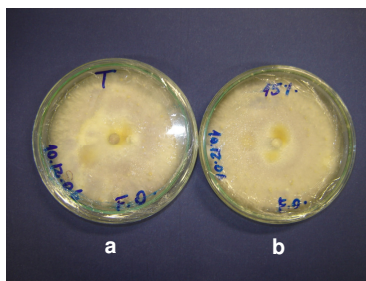


Figura 30. Crescimento do fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum* em meio sólido contendo (a) 0% e (b) 15% de filtrado do fECM *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt188), sem carvão ativo.

Além da espécie fúngica, o pH do meio de cultura pode influenciar e, até mesmo, potencializar a atividade inibitória de um determinado composto ou substância presente no mesmo. Considerando-se que não foi realizado ajuste de pH dos meios de cultura, após a adição dos filtrados fúngicos, é possível que esse fator tenha variado e influenciado os resultados. Estudos utilizando filtrado fúngico do fECM *Paxillus* sp. mostraram atividade antifúngica contra o fitopatógeno *Pythium vexans* entre valores de pH 3 e 4, porém nenhuma atividade entre pH 5 e 10 (YAMAJI *et al.*, 2005).

5.4.3. Testes de antagonismo de fungos ectomicorrízicos em relação a fitopatógeno em meio sólido

Em virtude de os fECM *Rhizopogon nigrescens* e *Pisolithus microcarpus* apresentarem velocidade de crescimento inferior a *Fusarium oxysporum*, a inoculação dos primeiros no meio de confrontação foi realizada 3 dias antes da inoculação do fitopatógeno.

O isolado UFSc-Rh90 promoveu inibição de *F. oxysporum*, tanto na presença quando na ausência de carvão ativo no meio de cultura, como ilustrado na Figura 31. Entretanto, observa-se que a inibição foi mais pronunciada no meio de cultura sem carvão ativo (Figura 31a).

Pelo fato de o carvão ativo apresentar capacidade adsorviva, é provável que tenha adsorvido parte dos metabólitos tóxicos ao fitopatógeno produzidos pelo fungo ectomicorrízico e, conseqüentemente, diminuído a intensidade do fenômeno de inibição. Além disso, observou-se alteração na coloração do meio de cultura sem carvão ativo, provavelmente pela secreção de pigmentos pelo fungo ectomicorrízico, fato que não pode ser observado no meio com carvão devido à coloração escura própria do meio. Suh *et al.* (1991) correlacionaram a produção de compostos extracelulares de cor marrom com a inibição de fitopatógenos em testes de antagonismo por confrontação direta utilizando o fungo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius*. Verificaram, também, que esses compostos pigmentados responsáveis pela inibição eram substâncias fenólicas. Inibição de fitopatógenos, ligada à produção de pigmentos escuros por fECM, também foi observada por Kope e Fortin (1989).

Quando testou-se o fungo *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt188), houve inibição, apenas na ausência de carvão ativo no meio (Figura 32). Nesse meio sem carvão ativo (Figura 32a), o fungo ectomicorrízico secretou, também, compostos extracelulares com pigmentação marrom. Mas ao contrário do caso anterior com o isolado UFSC-Rh90, o isolado UFSC-Pt188 não causou inibição na presença de carvão, o que pode indicar que o carvão adsorveu os metabólitos inibitórios.

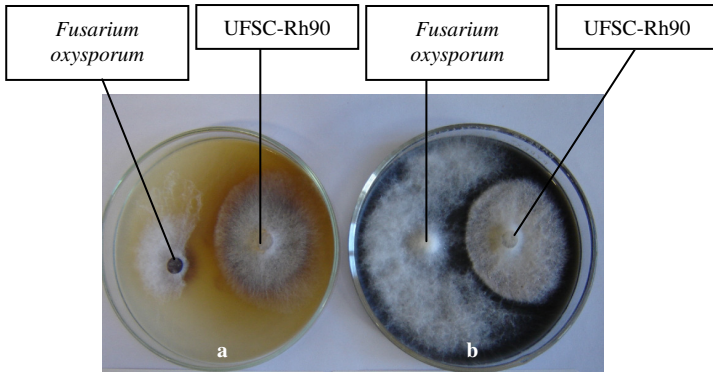


Figura 31. Antagonismo do fungo ectomicorrízico *Rhizopogon nigrescens* (UFSC-Rh90) em (a) meio sem carvão ativo e (b) com carvão ativo em relação ao fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Observe-se a intensa pigmentação marrom, produzida pelo isolado UFSC-Rh90, no meio sem carvão.

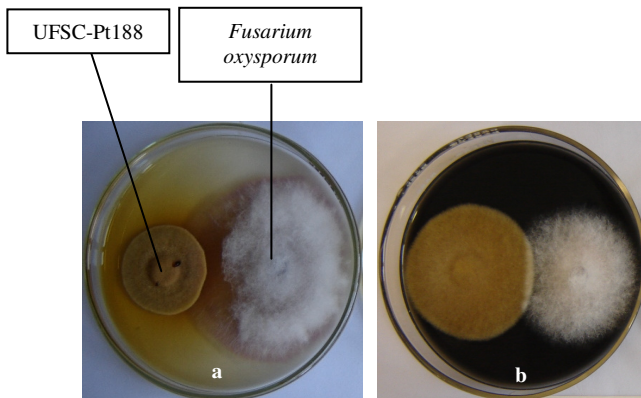


Figura 32. Antagonismo do fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus* (UFSC-Pt188) em (a) meio com carvão ativo e (b) meio com carvão ativo, em relação ao fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Observe-se a intensa pigmentação marrom, produzida pelo isolado UFSC-Pt188, no meio sem carvão.

Alguns autores acreditam que certos fungos ectomicorrízicos inibem outros microrganismos devido à acidificação do meio de cultura e não devido à produção de algum metabólito com propriedades antifúngicas ou antibacterianas (DUCHESNE *et al.*, 1989; RASANAYAGAM e JEFFRIES, 1992). Mas se esse fosse o mecanismo no presente caso, não haveria como explicar o fato de o isolado UFSC-Rh90 ter causado inibição no fitopatógeno nos meios com e sem carvão e o isolado UFSC-Pt188 só ter provocado esse efeito no meio sem carvão, já que este último é o que mais acidifica o meio de cultura durante seu cultivo (ROSSI, 2006). Pode-se inferir, então, que os casos de inibição observados não foram provocados pela acidificação do meio, mas pela liberação de composto(s) com propriedades antifúngicas, cuja natureza resta a desvendar.

Vários mecanismos têm sido considerados para explicar a inibição do crescimento de fitopatógeno ou mesmo a supressão de doença em plantas por parte de fungos ectomicorrízicos. Duchesne *et al.* (1988) citam a produção de compostos solúveis em etanol pelo fungo *Paxillus involutus* e Kope *et al.* (1991) isolaram compostos com atividade antifúngica (ácidos benzoilfórmico e mandélico) em filtrado de cultura de *Pisolithus tinctorius*. Sylvia e Synclair (1983), por sua vez, acreditam que compostos fenólicos produzidos pelo fECM *Laccaria laccata* estariam envolvidos na indução da resistência de plantas de *Pseudotsuga menziesii* a fungos patogênicos.

5.4.4. Atividade antifúngica e antibacteriana dos metabólitos extracelulares de fungos ectomicorrízicos

Os filtrados fúngicos liofilizados dos isolados UFSC-Rh90 e UFSC-Sc42, obtidos após 10 dias de cultivo em frascos estáticos em meio líquido PGKM, com e sem carvão, não apresentaram efeito inibitório sobre os microrganismos indicadores *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Candida albicans* (ATCC14053), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) e *Escherichia coli* (ATCC25922). Isso é comprovado pela ausência de halo de inibição ao redor dos poços onde foram depositados os filtrados fúngicos liofilizados (Figura 33).

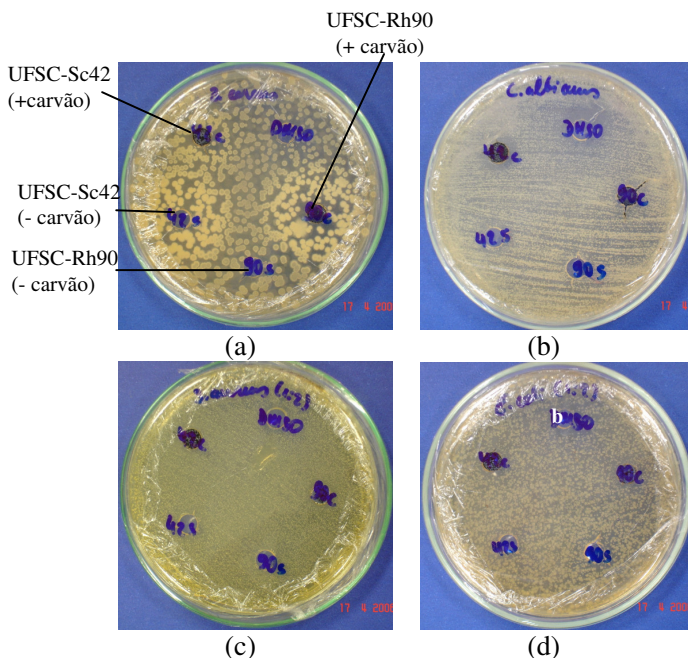


Figura 33. Teste de difusão dos filtrados de cultura dos isolados fúngicos ectomicorrízicos, UFSC-Rh90 e UFSC-Sc42, utilizando como indicadores os microrganismos: (a) *Bacillus cereus* (ATCC 11778); (b) *Candida albicans* (ATCC14053); (c) *Staphylococcus aureus* (ATCC25923); (d) *Escherichia coli* (ATCC25922).

Apesar de não ter apresentado efeito antibacteriano no presente ensaio, o filtrado de cultura do isolado UFSC-Sc42, quando submetido a teste para quantificação de compostos fenólicos, produziu $4,57 \text{ mg.L}^{-1}$. Porém, não foi determinado se esses compostos eram de alta ou baixa massa molecular. Estes últimos são aqueles considerados com maior ação antifúngica [HARBORNE, 1980, apud MÜNZENBERGER et al. 1990]. Pelos resultados observados, os compostos fenólicos detectados seriam de alta massa molecular já que não houve efeito inibidor sobre as bactérias e o fungo *Candida albicans*. Rossi (2006), ao examinar filtrados da cultura dos isolados UFSC-Pt188 e UFSC-Ch163 encontrou concentrações elevadas de compostos fenólicos de alta massa molecular.

5.5. Caracterização dos metabólitos tóxicos extracelulares e intracelulares de fungos ectomicorrízicos

5.5.1. Separação e identificação

Em meio líquido, o isolado UFSC-Rh90 apresentou crescimento satisfatório, mesmo sem a presença de carvão ativo, o que significa alta viabilidade do micélio. Já o isolado UFSC-Pt188, embora apresentasse rápido crescimento em meio sólido, cresceu lentamente em meio líquido. Este isolado produz grande quantidade de pigmentos durante seu cultivo e perde rapidamente a viabilidade após fragmentação, se o carvão ativo não estiver presente na suspensão miceliana.

Nesse contexto, procurou-se verificar as diferenças entre o espectro dos compostos presentes no filtrado (meio de cultivo) e no micélio do isolado com elevada auto-inibição (UFSC-Pt188) e do isolado com baixa auto-inibição (UFSC-Rh90), com o auxílio das técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG) e espectroscopia de infravermelho (EI). Os extratos analisados foram aqueles obtidos com o solvente acetato de etila, por terem apresentado visualmente melhor rendimento na extração.

A Figura 34 mostra os resultados obtidos em CCD dos extratos de acetato de etila dos filtrados fúngicos e do micélio dos isolados UFSC-Rh90 e UFSC-Pt188 quando revelados em anisaldeído sulfúrico, para os quais obtiveram-se as melhores revelações. A análise cromatográfica revelou um mesmo perfil, tanto para o filtrado como para a fração intracelular (micélio) do isolado UFSC-Pt188. Já no filtrado do isolado UFSC-Rh90, o perfil apresentou diferenças, pois verificaram-se bandas mais escuras, embora tenham sido observadas também algumas semelhanças entre as duas frações (extracelular e intracelular).

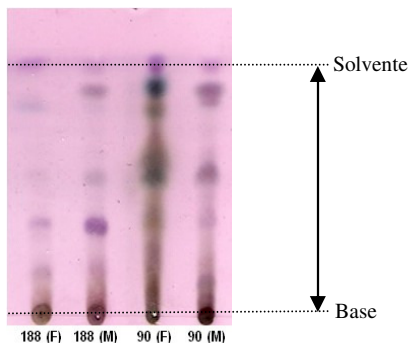


Figura 34. Análise qualitativa por CCD no filtrado e no micélio obtidos por cultivo estático em meio líquido. 188 (F): Filtrado do isolado UFSC-Pt188; 188 (M) micélio do isolado UFSC-Pt188; 90 (F) filtrado do isolado UFSC-Rh90; 90 (M) micélio do isolado UFSC-Rh90.

Pode-se observar que a quantidade de compostos produzidos pelo isolado UFSC-Rh90, e liberados no filtrado [90 (F)], foi bem maior do que a quantidade presente no micélio [90 (M)]. Não se soube afirmar, porém, se esse resultado foi devido a uma grande produção de metabólitos secundários por esse isolado ou se foi devido ao fato de o filtrado possuir resíduos de meio de cultura que não foram totalmente metabolizados, ao passo que o extrato do micélio estava livre da presença de tais substâncias.

Quanto ao isolado UFSC-Pt188, esse fenômeno não foi notado, verificando-se aparentemente uma igual quantidade de compostos tanto no filtrado quanto no micélio. É possível, porém, que o reduzido crescimento desse isolado em alguns frascos possa ter contribuído para diminuir a concentração de alguns metabólitos e impossibilitado sua detecção por esta técnica.

Quando os extratos foram submetidos à cromatografia gasosa, observaram-se diferenças entre os compostos presentes no filtrado e no micélio do mesmo isolado. Tais diferenças foram evidenciadas pelos diferentes tempos de retenção. As Figuras 35 e 36 apresentam a sobreposição dos cromatogramas do filtrado e do micélio dos isolados UFSC-Rh90 e UFSC-Pt188, respectivamente.

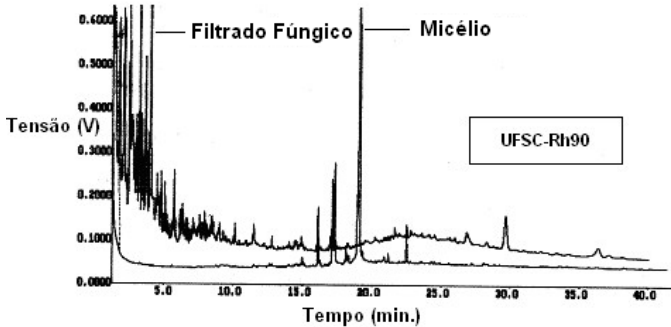


Figura 35. Sobreposição dos cromatogramas do filtrado e do micélio para o isolado UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*), obtidos por cromatografia gasosa.

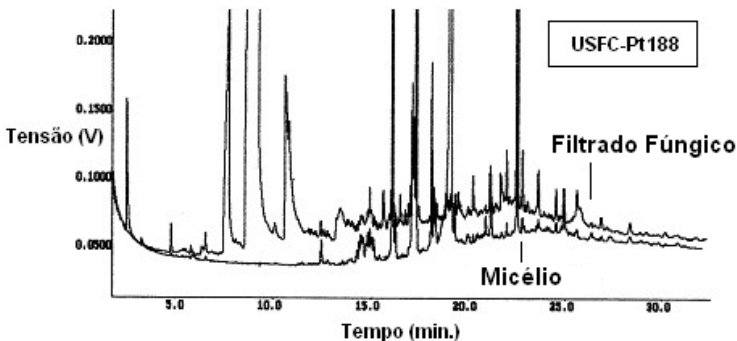


Figura 36. Sobreposição dos cromatogramas do filtrado e do micélio para o isolado UFSC-Pt188 (*Pisolithus microcarpus*), obtidos por cromatografia gasosa.

Uma análise preliminar desses cromatogramas permitiu observar uma maior quantidade de compostos liberados no filtrado do que na fração intracelular (micélio) dos dois isolados corroborando os resultados obtidos nas análises de cromatografia em camada delgada. Esses resultados são importantes, pois apontam para diferenças que podem estar envolvidas na questão da viabilidade do micélio.

A utilização de técnicas como espectrometria de massa e espectrometria de ressonância magnética nuclear poderia fornecer maiores

informações acerca desses compostos. Além destas, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. Porém, mesmo que essas técnicas sejam aplicadas, é necessário considerar que o material em estudo contém uma mistura de compostos e não apenas um composto isolado, o que demandaria etapas adicionais de purificação.

A espectroscopia de infravermelho possibilitou a obtenção de maiores informações acerca das classes de compostos orgânicos majoritariamente presentes nos extratos do filtrado fúngico e do micélio dos isolados UFSC-Rh90 e UFSC-Pt188.

As Figuras 37, 38, 39 e 40 mostram os espectros de infravermelho do filtrado fúngico do isolado UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*), extrato de micélio do isolado UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*), o filtrado fúngico do isolado UFSC-Pt188 (*Pisolithus microcarpus*) e extrato de micélio do isolado UFSC-Pt188 (*Pisolithus microcarpus*) respectivamente.

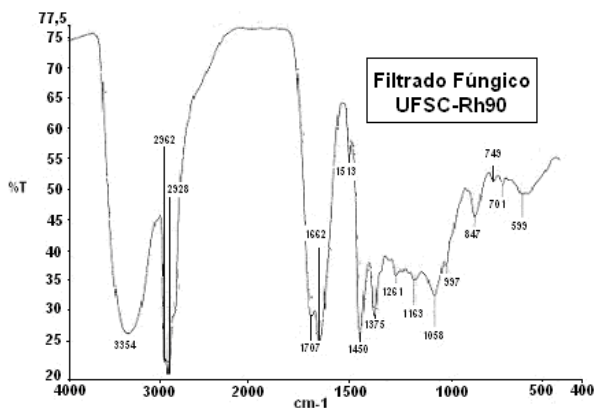


Figura 37. Espectro de infravermelho do filtrado do isolado UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*).

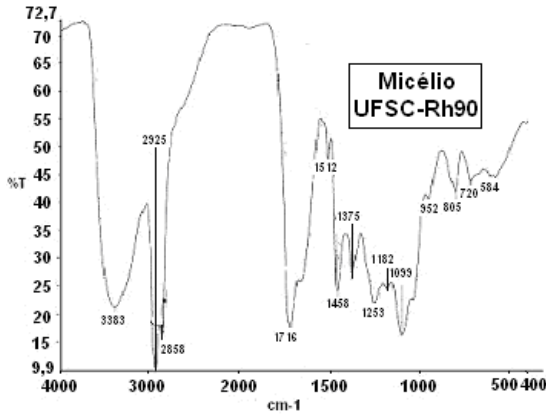


Figura 38. Espectro de infravermelho do extrato de micélio do isolado UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*).

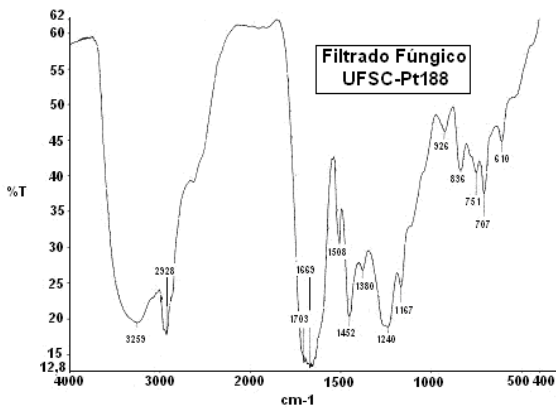


Figura 39. Espectro de infravermelho do filtrado do isolado UFSC-Pt188 (*Pisolithus microcarpus*).

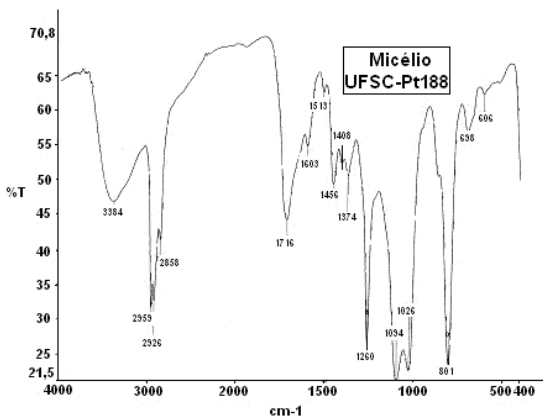


Figura 40. Espectro de infravermelho do extrato de micélio do isolado UFSC-Pt188 (*Pisolithus microcarpus*).

Quadro 3. Bandas significativas no Espectro de Infravermelho do filtrado e do micélio dos isolados UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*) e UFSC-Pt188 (*Pisolithus microcarpus*).

Fração	Bandas (cm ⁻¹)
Filtrado Rh 90	3354, 2962, 2928, 2749, 1450 e 1375, 1707, 1662, 1261, 1513, 1058.
Micélio Rh 90	3383, 2925-2720, 1458 e 1375, 1716, 1253, 1512
Filtrado Rh 188	3259, 2989, 2360, 2929, 1703, 1669, 1508, 1452, 1380, 1240, 836, 751, 707, 610
Micélio Rh 188	3384, 2959, 2926, 2858, 1716, 1603, 1513, 1456, 1374, 1260, 1094, 1026, 801, 698

Nos espectros de infravermelho destes extratos são observadas intensas bandas de absorção na região de 3.300 cm⁻¹ indicando a presença de compostos hidroxilados que associado a intensa banda de absorção devido a estiramento de carbonila na região de 1700 cm⁻¹ e a forte absorção de estiramento de C-H alifático em 2990-2820 cm⁻¹, típica de cadeias longas hidrocarbonadas alifática, pode-se inferir a forte presença de ácidos graxos. Estudos realizados por Martin *et al.* (1984b) mostraram que o micélio dos fECM *Cenococcum graniforme* e

Hebeloma crustuliniforme apresentava grande quantidade de ácidos graxos insaturados acumulados.

No entanto, a alta intensidade da banda de absorção devido ao estiramento OH e fortes absorções na região de 1050 cm^{-1} atribuído ao estiramento de ligações O-C é um forte indicativo da presença de carboidratos. Martin *et al.* (1984a) identificaram a presença dos carboidratos de reserva manitol, glicerol e trealose nos fECM *Cenococcum graniforme*, *Hebeloma crustuliniforme* e *Laccaria próxima*.

Considerando que o estiramento da ligação O-Csp³, como aquelas de alcoóis e éteres alifáticos, absorve tipicamente em 1050 cm^{-1} e o da ligação O-Csp² em 1250 cm^{-1} (no caso da ligação O-CO do grupo carboxila), é possível avaliar a abundância relativa de ácidos graxos e carboidratos nos referidos extratos. Por ex., no espectro de infravermelho do extrato de micélio do isolado UFSC-Rh90 (Figura 38), observa-se uma predominância da banda de absorção em 1058 cm^{-1} (C-O açúcar) em relação 1253 cm^{-1} (C-O ácido graxo). Já no espectro de infravermelho do filtrado do isolado UFSC-Pt188 (Figura 39) a predominância é da banda em 1240 cm^{-1} (C-O ácido graxo) indicando que neste extrato os principais constituintes são ácidos graxos. Pode-se observar que a absorção na região de 1050 cm^{-1} (C-O açúcar) está praticamente encoberta. Por outro lado, no espectro de infravermelho do filtrado do isolado UFSC-Pt188, observa-se a nítida predominância da absorção em 1054 cm^{-1} com uma absorção de carbonila bem menos intensa, o que pode estar indicando uma sensível predominância de açúcares neste extrato.

Entretanto, para a completa caracterização funcional e estrutural desses compostos, é imprescindível desenvolver técnicas de isolamento e posterior análises espectroscópicas de RMN ¹H, RMN ¹³C com análises bidimensionais Cosy, HSQC e HMBC e espectrometria de massas.

5.5.2. Testes de inibição contra fungo ectomicorrízico utilizando-se metabólitos intracelulares do próprio fungo

Os resultados aqui apresentados referem-se às frações aquosa e de acetato de etila, oriundas do processo de extração líquido-líquido dos metabólitos intracelulares do fECM *Scleroderma* sp. (UFSC-Sc42), conforme ilustrado no esquema da Figura 12.

A Figura 41 mostra o crescimento do fungo nos testes de inibição em meio sólido, com e sem carvão ativo, utilizando-se metabólitos intracelulares da fração aquosa obtida no processo de extração de metabólitos do micélio do próprio fungo. Na Figura 42, apresenta-se o cres-

cimento do mesmo fungo nos tratamentos testemunha (sem metabólitos intracelulares).

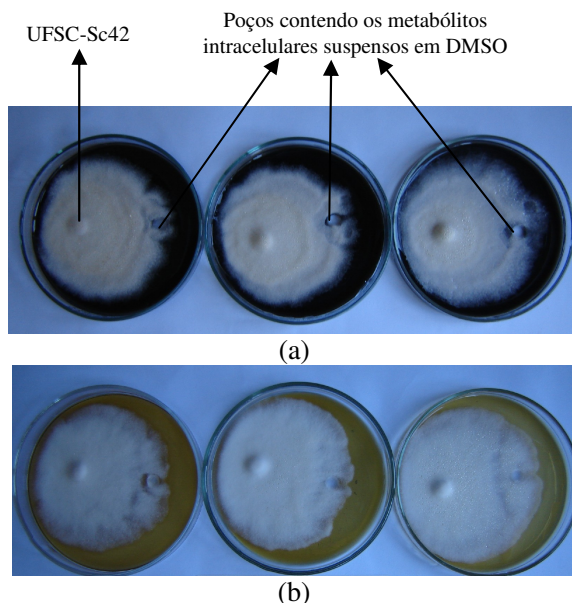


Figura 41. Teste de inibição com o fungo ectomicorrízico *Scleroderma* sp. (UFSC-Sc42) em meio sólido utilizando metabólitos intracelulares da fração aquosa obtida no processo de extração de metabólitos do próprio micélio fúngico. (a) meio com carvão ativo; (b) sem carvão ativo.

Comparando-se os resultados ilustrados na Figura 41 com aqueles obtidos com os tratamentos testemunhas (Figura 42), verifica-se que não houve inibição de crescimento do fungo ectomicorrízico por parte de seus próprios metabólitos intracelulares presentes na fração aquosa. Nenhum halo de inibição do crescimento foi observado ao redor dos poços onde foram depositados os metabólitos suspensos em DMSO. Esse teste, embora amplamente descrito na literatura para determinar a toxicidade de extratos de um microrganismo frente a outros microrganismos, como microrganismos patogênicos, foi utilizado pela primeira vez no presente trabalho para testar a inibição de metabólitos contra o próprio microrganismo produtor.

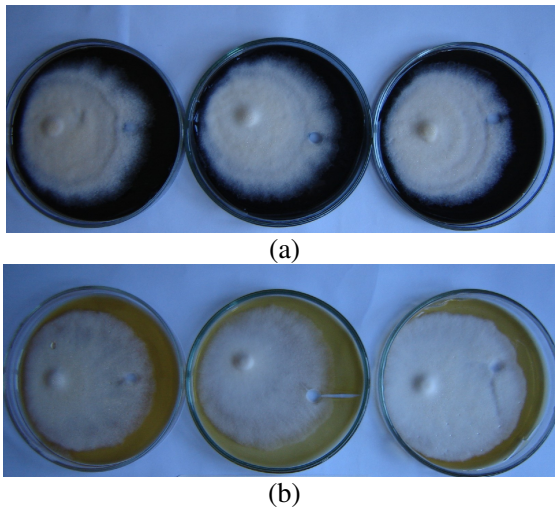


Figura 42. Tratamentos testemunha do teste de inibição utilizando o fungo *Scleroderma* sp. (UFSC-Sc42), sem a presença de metabólitos intracelulares: (a) meio com carvão; (b) meio sem carvão.

Porém, a adição de metabólitos intracelulares, oriundos da fração orgânica (acetato de etila), ao meio de cultura, teve um efeito negativo sobre o crescimento desse fungo, diminuindo o diâmetro da colônia (Figura 43). Além disso, observou-se que essa resposta foi independente da adição ou não de carvão ativo, embora o fungo tenha apresentado um melhor crescimento em meio sem carvão ativo (ver item 5.3.). A análise de variância encontra-se no Anexo 5.

O diâmetro médio para a cultura que recebeu a fração de acetato de etila foi menor (2,5 cm) quando comparado a testemunha (3,5 cm). Verificou-se que a adição de metabólitos intracelulares presentes na fração de acetato de etila provocou diminuição do diâmetro da área de crescimento do fungo, independentemente da adição ou não de carvão ativo (Figuras 44 e 45).

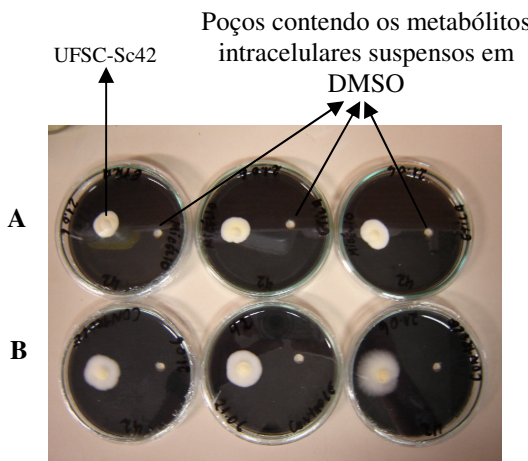


Figura 44. Aspecto das colônias do fungo ectomicorrízico *Scleroderma* sp. (UFSC-Sc42) em meio sólido com carvão ativo: (A) em presença de extrato de micélio da fração acetato de etila; e (B) sem extrato de micélio (testemunha).

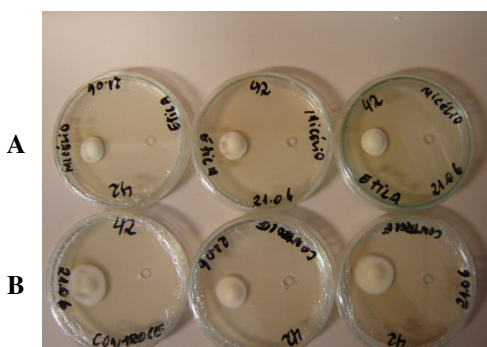


Figura 45. Aspecto das colônias do fungo ectomicorrízico *Scleroderma* sp. (UFSC-Sc42) em meio sólido sem carvão ativo: (A) em presença de extrato de micélio da fração acetato de etila e (B) sem extrato de micélio (testemunha).

Embora possam ser encontrados estudos relacionados à produção de metabólitos secundários de fungos ectomicorrízicos, com propriedades antifúngicas ou antibióticas em relação a outros organismos (SYLVIA e SYNCLAIR, 1983; DUCHESNE *et al.*, 1988, 1989; KOPE *et al.*, 1991), não foram encontrados estudos sobre o efeito desses metabólitos no crescimento do próprio fungo produtor (auto-inibição). Esta informação demonstra a escassez de dados sobre os aspectos do crescimento de fungos ectomicorrízicos em processos de produção de inoculantes e a dificuldade de se estabelecerem metodologias para este fim.

Entretanto, esse processo de auto-inibição é um dos principais entraves ao desenvolvimento de tecnologia para produção de inoculante. É importante que esses metabólitos sejam identificados e que sejam encontradas formas de anular seu efeito inibidor durante o processo de produção de inoculante, quando é necessária a obtenção de grande quantidade de biomassa. As informações aqui obtidas apontam que esses compostos inibidores são produzidos intracelularmente e liberados durante a fragmentação. Tais compostos são insolúveis em água e solúveis em solventes menos polares.

5.5.3. Testes de inibição de extratos de fungos ectomicorrízicos contra fungo fitopatogênico e bactérias patogênicas ao homem

Os resultados aqui apresentados referem-se às frações aquosas, oriundas do processo de extração líquido-líquido dos metabólitos intracelulares (micélio fúngico) e extracelulares (filtrado) de *Scleroderma* sp. (UFSC-Sc42) (ver Figura 8). Os resultados deste estudo mostraram que as frações aquosas dos metabólitos intracelulares não apresentaram propriedades antifúngicas frente ao fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Na Figura 46 observa-se que o fitopatógeno cobriu toda a superfície do meio de cultura após poucos dias de incubação. Esse rápido e intenso crescimento do fitopatógeno também foi observado no tratamento testemunha, sem o extrato do fungo ectomicorrízico (Figura 47).

Mais uma vez, observa-se que a fração aquosa dos metabólitos intracelulares do isolado ectomicorrízico UFSC-Sc42 não apresenta propriedades antifúngicas, seja contra o próprio fungo produtor (item 5.5.2.), seja contra o fitopatógeno. Teria sido interessante testar a fração em acetato de etila para verificar se essa fração tinha efeito sobre o fungo fitopatogênico à semelhança do que foi observado contra o próprio isolado. As poucas informações disponíveis na literatura dão conta de

que os metabólitos produzidos por fECM, com efeitos inibidores sobre outros microrganismos, são compostos solúveis em solventes orgânicos.

Os antibióticos ácido *p*-hidroxibenzoilfórmico [ácido 2-(4'-hidroxifenil)-2-oxoeta-nóico, pisolithina A] e ácido (*R*)-(-)-*p*-hidroximandélico [(*R*)-(-)-2-(4'-hidroxifenil)-2-hidroxieta-nóico, pisolithina B] foram isolados de cultura de *Pisolithus tinctorius* (Kope *et al.*, 1991). Esses metabólitos, e uns poucos compostos estruturalmente relacionados apresentaram efeito inibidor na germinação de esporos e causaram lise das hifas de vários fungos fitopatogênicos e dermatófitos.

Assim, os resultados obtidos com a fração aquosa indicam que a falta de inibição poderia estar relacionada à ineficiência do solvente empregado em extrair a fração adequada dos metabólitos capaz de causar efeito inibitório.

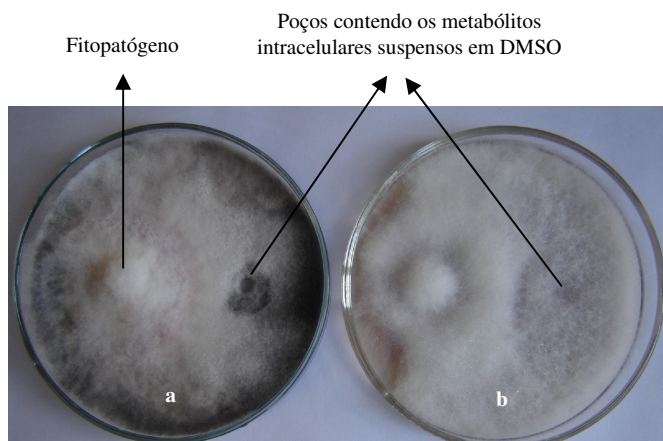


Figura 46. Teste de inibição com o fitopatógeno *Fusarium oxysporum* em meio sólido utilizando metabólitos intracelulares da fração aquosa obtida no processo de extração de metabólitos do micélio fúngico do *Scleroderma* sp. (UFSC-Sc42) (a) meio com carvão; (b) sem carvão.

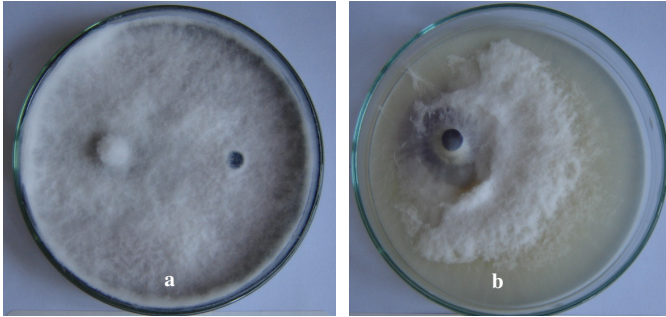


Figura 47. Tratamentos testemunha do teste de inibição utilizando o fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. (a) meio com carvão; (b) meio sem carvão.

Já para os testes com microrganismos patogênicos do homem, foram utilizadas as frações aquosas resultantes das extrações líquido-líquido tanto dos metabólitos intracelulares, quanto dos extracelulares (filtrado fúngico) (Figura 48).

Também neste caso, verificou-se que a fração resultante da extração líquido-líquido do filtrado fúngico (extracelular) não foi capaz de inibir os microrganismos testados. Contudo, a fração oriunda da extração dos metabólitos intracelulares foi capaz de inibir a bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), produzindo halo de inibição de 9 mm (Figura 48c). Esses resultados reforçam a hipótese da presença de metabólitos com ação tóxica na porção intracelular, seja da fase aquosa ou da fase orgânica.

Garrido *et al.* (1982) verificaram propriedades antibióticas em frações oriundas de extrações com solvente éter de petróleo de culturas de fungos ectomicorrízicos frente aos microrganismos patogênicos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*.

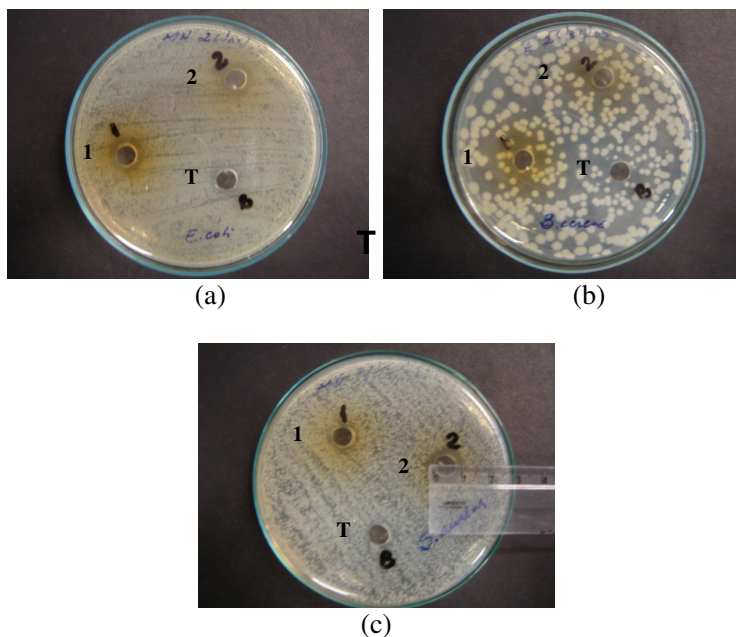


Figura 48. Teste de difusão utilizando as frações aquosas resultantes das extrações líquido-líquido do filtrado do isolado *Scleroderma* sp. (UFSC-Sc42) (1) e dos metabólitos intracelulares (2) UFSC-Sc42. (a) *Escherichia coli* (ATCC25922); (b) *Bacillus cereus* (ATCC 11778); (c) *Staphylococcus aureus* (ATCC25923). (T) testemunha.

5.6. Acompanhamento da viabilidade de fungos ectomicorrízicos e investigação dos metabólitos intracelulares através de cromatografia de camada delgada (CCD)

Quando as amostras foram submetidas à técnica de cromatografia em camada delgada, a combinação de solventes utilizada não permitiu a obtenção de manchas que pudessem evidenciar diferenças no perfil de compostos entre as amostras tratadas com carvão e as amostras não tratadas.

Entretanto, revelaram a presença de compostos altamente polares que só poderiam ser identificados com o uso da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de massa acoplada. Esta técnica, no entanto, não estava disponível no período de execução deste

estudo. Por outro lado, pode-se utilizar menor quantidade de carvão, evitando assim a diluição da amostra, bem como a utilização de diferentes solventes para dessorção dos compostos adsorvidos no carvão para sua posterior análise em CCD.

5.7. Instrumentalização do biorreator *airlift*

Com os sinais de tensão estabilizados e o sistema operando normalmente, passou-se a testar o programa BRF.vi, desenvolvido para atuar sobre as variações pontuais resultantes de pulsos de ácido e da remoção do oxigênio da água com a injeção de nitrogênio. Como o comportamento da hidrodinâmica do biorreator em questão difere bastante do comportamento de um biorreator convencional de tanque agitado, foi importante a obtenção prévia dessa informação a partir do trabalho de Rossi (2006), para efetuar os ajustes de parâmetros e valores limite do sistema de controle.

Por exemplo, na atuação do sistema de controle do pH, se for adicionado um certo volume de base, decorrerá um certo tempo, necessário para a homogeneização da concentração hidrogeniônica, antes de o sistema interpretar como necessária ou não uma nova ação (adição de base ou ácido). Isso é definido pelas características hidrodinâmicas de mistura do biorreator *airlift* em função da velocidade do gás.

Na arquitetura do sistema, foram explorados muitos dos recursos já disponíveis no laboratório. Como o banho termostatzado para controle da temperatura tem seu próprio controlador PID, o controle desse parâmetro é local, não sobrecarregando o bloco do sistema central de controle, sendo este o motivo de o equipamento não aparecer no diagrama P&I.

Isso terá conseqüências tanto positivas como negativas. O aspecto positivo é que se ocorrer uma falha de fornecimento de energia, o programa de controle não reinicia automaticamente, mas o controle de temperatura, que não depende dele, voltará a operar normalmente. O ponto negativo é que, caso se deseje, não se poderá modificar a temperatura de processo remotamente. Atualmente, o banho termostatzado utiliza a informação de temperatura interna da água para controle, o que provoca certa variação na temperatura do cultivo, em função da variação da temperatura do ambiente. Entretanto, o equipamento possui uma conexão para termômetro externo do tipo termopar. Esse tipo de termômetro é de construção fácil e de baixo custo, e será uma implementação simples que tornará o controle de temperatura mais preciso.

Outra característica do sistema desenvolvido é o controle do pH, em que se utiliza o controlador interno do transmissor 2100e da Mettler Toledo, para comandar os relés que acionam as bombas de ácido e base. Também neste caso, quando a energia retorna após uma queda, o sistema de controle volta a operar normalmente, e faltarão apenas os registros dos dados, já que o programa de controle no CP não se reinicia automaticamente. Poder-se-ia estudar uma forma de o programa BRF.vi funcionar automaticamente após uma queda de energia, entretanto, o programa necessitaria sempre de parâmetros de calibração que são inseridos via teclado. Esse problema, por enquanto, poderá ser atenuado com a utilização de um *nobreak* com uma bateria de longa duração.

Finalmente, após ajustes do programa BRF.vi e pré-testes com simulação de pulsos de ácido/base e de remoção de O₂ com nitrogênio, realizados em água, o sistema foi confrontado com um cultivo real, utilizando-se bactérias do gênero *Bacillus*. As condições em cultivo foram muito diferentes daquelas obtidas com alterações provenientes de pulsos, pois em cultivo elas se modificam continuamente com o tempo. Nesse momento do trabalho, como o tempo de serviço contratado com o técnico especializado da Real Automação já estava se esgotando, o sistema de controle foi confrontado apenas com a fase inicial do cultivo microbiano, onde a atividade dos microrganismos não estava suficientemente alta para testar a eficiência do programa.

No período inicial de cultivo dessa bactéria, o sistema respondeu perfeitamente, realizando o controle preciso das variáveis pH e oxigênio dissolvido (OD). Entretanto, com o avanço do cultivo, na medida em que a atividade microbiana se intensificava em função do aumento da biomassa, o sistema se revelou instável para o controle do OD. O que se observa nos dados de cultivo (Figura 49), é que dentro da faixa longa de tempo, que o controle necessita para diminuir o erro em relação ao valor desejado, o cultivo já apresentava nova modificação (as variações são de ordem crescente de acordo com o aumento das células) que gerava instabilidade no resultado da ação de controle. Isso resultava numa variação ampla da concentração de OD (da ordem de 20 % sobre a crítica estabelecida, de 50 % neste caso), o que gerava variações bruscas na vazão de ar, com efeitos deletérios sobre o cultivo. Já as outras variáveis (pH, T) foram perfeitamente controladas.

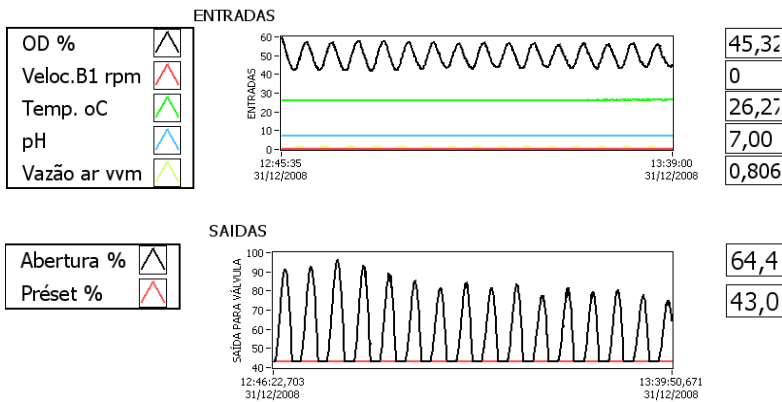


Figura 49. Gráficos da interface gráfica do programa BRF.vi, mostrando o comportamento das entradas e saídas de sinal durante a fase intensa do metabolismo em cultivo de *Bacillus* sp. A linha vermelha da saída é a abertura mínima da válvula de ar (*préset*) e a linha preta mostra a variação da abertura da válvula na tentativa de estabilizar a concentração de OD.

A Figura 49 mostra os dados referentes a um período de aproximadamente uma hora, onde se observa uma tendência progressiva de uma menor abertura da válvula para a mesma variação nos níveis de OD. Isto pode significar um efeito do estresse sobre o metabolismo, resultante da variação da agitação. A solução para essa instabilidade poderá ser simples, caso o controlador esteja com um ganho (quociente entre a taxa de mudança da saída e a taxa de mudança da entrada que a causou) muito alto. Ou mais complexa, caso seja necessário desenvolver um controlador moderno com ganho adaptativo (ganhos não-lineares, onde o sistema altera seus próprios parâmetros), pois as condições de cultivo mudam bastante com o tempo. De qualquer modo, essa representa outra etapa do desenvolvimento do BRF.vi, pois diversas situações de processo ainda devem ser testadas para melhor compreender os parâmetros necessários à sua evolução.

No item seguinte são apresentados os resultados de um cultivo em biorreator que explora as habilidades do sistema em efetuar o controle, e as conseqüências disso sobre os parâmetros cinéticos do crescimento de um isolado fúngico ectomicorrízico.

5.7.1 Estudo cinético do crescimento de fungo ectomicorrízico durante cultivo controlado em biorreator *airlift*

No cultivo do fungo ectomicorrízico, isolado UFSC-Rh90, com duração de cerca de 120 horas, foi possível realizar o primeiro teste do sistema de controle, sob condições assépticas de operação. De modo geral foi um cultivo bem sucedido, com um tempo considerado bastante curto, quando se trata de um fungo ectomicorrízico, e com uma elevada produção de biomassa.

Na Figura 50 são apresentados os resultados desse experimento, onde cada ponto representa um salto de 1200 dados experimentais, já que o sistema armazenava um dado a cada 3 segundos. Numa primeira análise dessa figura, observa-se a queda contínua nos níveis de OD em função do aumento da demanda até atingir o ponto crítico estabelecido. A partir desse ponto, permaneceu oscilando nesse patamar, enquanto a temperatura e pH permaneceram constantes.

Durante esse período destacaram-se três eventos principais: a) a diminuição intencional da abertura mínima da válvula de ar de 40 para 30 %, o que correspondia a uma diminuição de 0,30 para 0,21 vvm, durante um período de cerca de 24 horas; b) o fornecimento de energia foi interrompido no prédio, mas não foi possível determinar por quanto tempo, pois embora parte do sistema reinicie após esse evento, o programa BRF.vi não o faz e, neste caso, ficou inoperante durante cerca de 11 horas; c) houve erro de execução do BRF.vi (*bug*), permanecendo inoperante durante cerca de 10 horas.

O primeiro evento provocou inicialmente uma queda no nível de OD, o que era esperado já que menor quantidade de ar foi fornecida. Entretanto, essa queda ao longo do tempo se revela inconstante e os motivos são difíceis de estabelecer. Supõe-se que ocorreu uma combinação de eventos originados a partir da mudança do padrão hidrodinâmico, o que afetou tanto o microrganismo quanto o próprio sensor de OD, pela variação da pressão interna. Durante esse primeiro evento, também ocorreu uma queda de energia (ver detalhe na Figura 50), mas o sistema foi imediatamente reiniciado por ter sido detectado instantaneamente.

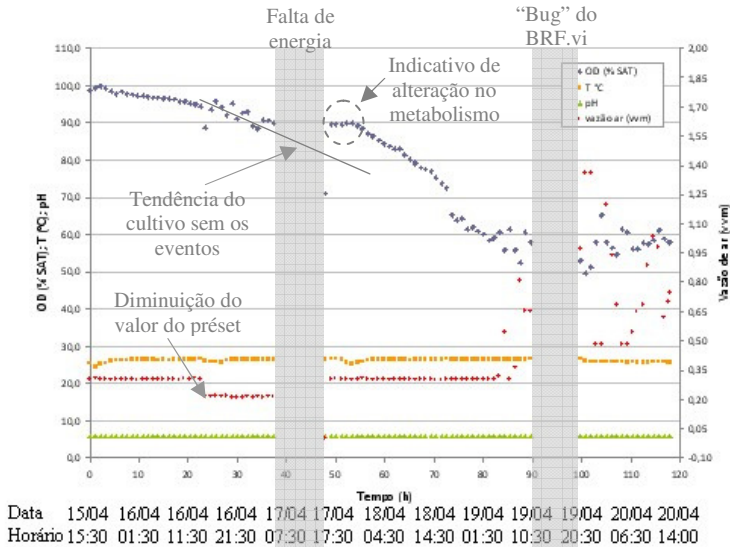


Figura 50. Dados do cultivo controlado do isolado UFSC-Rh90 (*Rizopogon nigrescens*) em meio PGKM, mostrando os vários eventos ocorridos. Os pontos estão em intervalos de 1 hora.

O segundo evento, cujos dados estão apresentados nas Figuras 55 e 56, revela como a falta de oxigênio afetou o metabolismo do fungo, como já verificado por Rossi (2006). Quando as condições operacionais, após a falta de energia, foram re-estabelecidas, os níveis de OD ficaram cerca de 5 horas num patamar estável de 90 % da saturação e não em 80%, como seria esperado caso fosse seguida a tendência da curva na Figura 51. É necessário esclarecer que com a interrupção da aeração, cessou a mistura e a biomassa depositou-se no fundo do biorreator, de modo que nem o oxigênio ainda dissolvido no meio de cultura poderia ser consumido totalmente, como mostram os valores relativamente elevados de OD no momento de retomada do processo. Assim, os eventos ocorridos podem ter atrasado em pelo menos 10 horas o momento para que o cultivo atingisse a concentração crítica estabelecida, o que representa um prejuízo ao desenvolvimento do cultivo, pois o número de células viáveis deve ter diminuído com a falta de oxigenação durante a interrupção da energia elétrica.

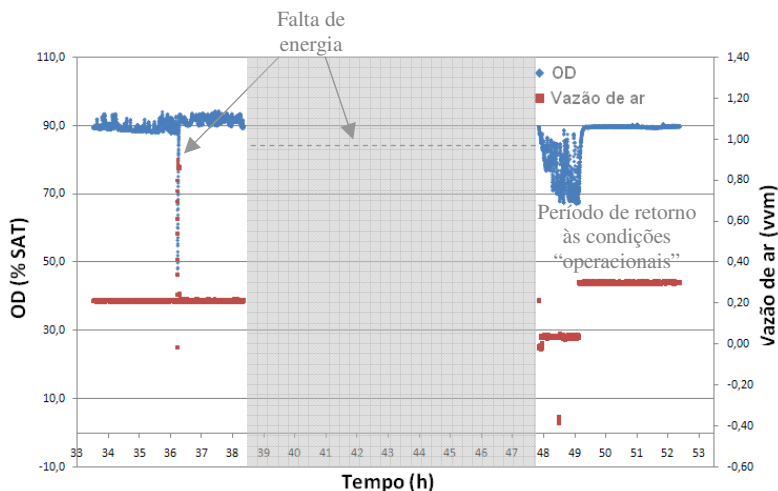


Figura 51. Informações do cultivo do isolado UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*) entre a 33^a e a 52^a hora, onde se observam os dois momentos de falta de energia e suas consequências sobre a concentração de oxigênio dissolvido.

No terceiro evento, no qual ocorreu o erro de execução do programa BRF.vi, não houve o registro dos dados e nem o controle sobre o OD (Figura 52). Entretanto, o sistema operou com a abertura mínima da válvula, o que evitou um estresse maior ao microrganismo. A partir da 80^a hora de cultivo (01:30 do dia 19/04 na Figura 50) o cultivo atingiu a concentração crítica estabelecida e o sistema iniciou o controle de forma a aumentar a abertura da válvula de ar para manter o nível de OD acima de 60 % da saturação. A partir desse ponto, verificou-se a mesma instabilidade do sistema, observada durante o cultivo da bactéria (Item 5.7), que representa a tentativa do sistema de controlar efetivamente o processo. Em certo grau, o controle era realizado, e o OD não chegava a baixar a menos que 50 % da saturação, mas isso representava um risco de elevar enormemente o estresse, o que se verificava pela enorme variação da vazão (de 0,5 a 1,30 vvm). Um indicativo desse estresse pode ser visto na intensa modificação da coloração do meio de cultura (Figura 53) nas últimas 14 horas de cultivo, o que revela um desvio de parte do

metabolismo voltado ao crescimento para um metabolismo secundário mais intenso.

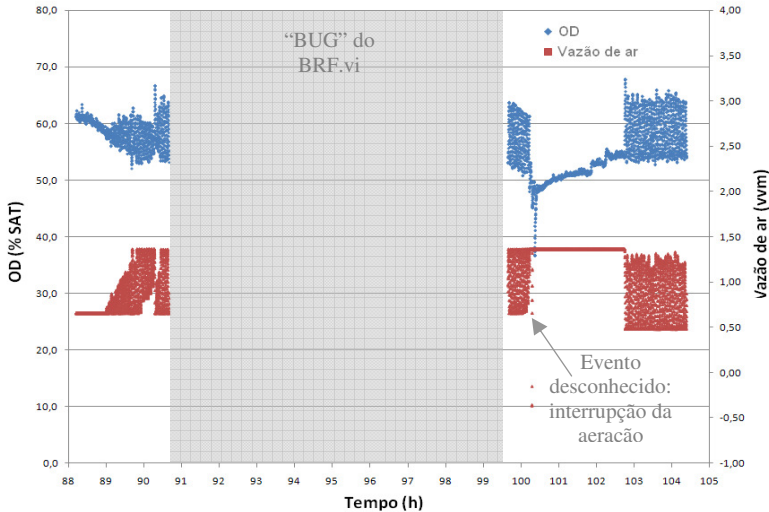


Figura 52. Informações do cultivo do isolado UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*), entre a 88^a e 104^a hora, mostrando o momento de erro ("Bug") na execução do BRF.vi e suas consequências sobre a concentração de oxigênio dissolvido.

Na Figura 57, também chama a atenção um evento ocorrido entre a 100^a e 101^a hora do cultivo, causado pela interrupção total da aeracão durante 12 segundos. Nesse momento de intensa atividade respiratória, esse evento momentâneo provocou uma queda da concentração de OD durante 4 minutos, até atingir a menor concentração em relação à saturação (36,7 %), para depois voltar a subir com a abertura total da válvula de ar (fornecendo uma vazão específica de 1,3 vvm). Houve uma demora de aproximadamente 26 min para que fossem atingidos os níveis de OD anteriores ao evento. Esse tempo elevado reflete o esforço do sistema para aumentar os níveis de OD ao mesmo tempo em que precisa atender a um consumo elevado e crescente. Tais observações ressaltam o principal propósito do desenvolvimento dos biorreatores, que se concentra principalmente nas questões de transferência de oxigênio

(SCHMIDELL, 2001). A partir do momento em que a concentração de OD atingiu a crítica estabelecida, recomeçou o problema da instabilidade do sistema de controle, que permaneceu dessa forma até o final do cultivo.

É importante salientar que esses resultados não podem ser visualizados nos referidos gráficos, sendo necessário se reportar aos dados numéricos para apreciá-los. Além disso, as escalas das ordenadas dos gráficos das Figuras 50, 51 e 52 foram estabelecidas intencionalmente diferentes para evitar a sobreposição dos pontos e melhorar sua apresentação.

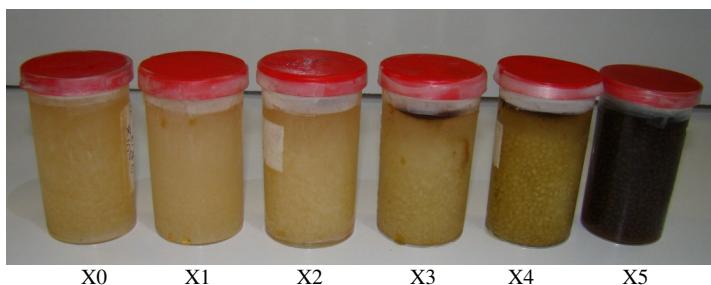


Figura 53. Aspectos das amostras retiradas durante o cultivo do isolado UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*), mostrando a intensa pigmentação do meio de cultura a partir da amostra X4 (85ª hora de cultivo).

Para controle do pH, observou-se que o consumo de ácido foi maior do que o de base, com cerca de 11,8 g de HCl consumidos contra apenas 8 g de NaOH. No entanto, no início do processo, houve uma maior consumo de HCl, o que indicava a provável utilização do ácido cítrico, um dos componentes do meio de cultura. Mas após as primeiras 40 horas, verificou-se um gasto intenso de NaOH, provavelmente devido à produção de ácidos orgânicos resultantes do metabolismo fúngico, principalmente do consumo de glicose. Na etapa final do cultivo (últimas 30 horas), novamente ocorreu um consumo maior de HCl, o que indicava o metabolismo dos componentes mais complexos do meio, como as proteínas da peptona e do extrato de malte. Esse comportamento poderia explicar o que foi observado por Rossi (2006), em cultivo do mesmo isolado, sem controle de pH, onde verificou-se uma elevação de pH no início do cultivo seguindo-se uma queda acentuada

durante quase todo o resto do período, mas com um novo aumento ao final do processo.

Na Figura 54 são apresentados os resultados obtidos através da análise de 6 amostras retiradas ao longo do tempo de cultivo. Observa-se que a biomassa obtida foi superior a $6,0 \text{ g.L}^{-1}$, o que determinou uma produtividade de $1,2 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, com quase toda a glicose consumida (Figura 55a). Este valor de biomassa foi muito superior ao observado com o isolado UFSC-Sc42 (Item 5.2), que produziu somente $0,33 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa. Já a conversão de substrato em biomassa (Figura 55b), que foi aproximadamente 41 %, considera-se um resultado bastante coerente com os dados já obtidos em cultivo de fungos ectomicorrízicos por outros autores (ROSSI *et al.*, 2005).

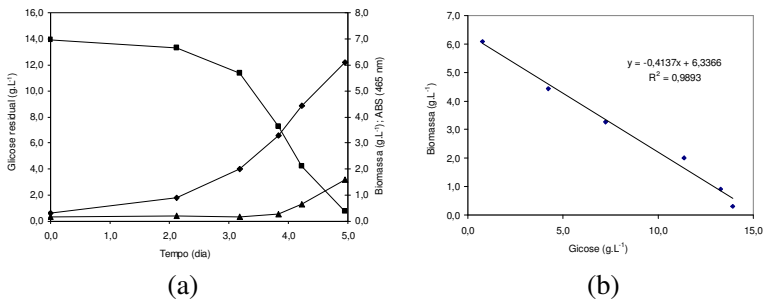


Figura 54. Produção de biomassa e consumo de glicose (a), e determinação da conversão de glicose em biomassa (b) para o cultivo do isolado UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*) em biorreator *airlift*. ■ glicose; ♦ biomassa; ▲ absorbância (465 nm)

A velocidade específica média de crescimento neste cultivo foi de $0,63 \text{ dia}^{-1}$ (Figura 55a). Esse valor chega a ser três vezes superior ao obtido em cultivo estático por Rossi (2006), porém, semelhante ao obtido por esse autor em biorreator nas mesmas condições de temperatura, com concentração inicial de inóculo de $0,47 \text{ g.L}^{-1}$ e com vazão específica de ar de $0,52 \text{ vvm}$. Analisando-se o perfil da velocidade específica de crescimento, verifica-se que em torno de 1,5 dias ela chegou a quase $1,0 \text{ dia}^{-1}$ (Figura 55b).

Apesar de a velocidade específica de crescimento ser considerada independente da concentração celular, estudos cinéticos desenvolvidos

por Rossi (2006) mostraram que o tamanho do inóculo (concentração de biomassa *versus* tamanho inicial dos propágulos) pode afetar esse parâmetro. Dessa forma, é mais prudente e confiável analisar o valor médio dessa velocidade, pois ela pode revelar o potencial máximo de produtividade que o processo pode alcançar.

Observando-se as figuras 50 a 55, verifica-se que a partir da 85ª hora de cultivo, as condições tornaram-se limitantes, pois a coloração do meio de cultura começou a se intensificar (Figura 53). Ocorreu desvio da tendência nas curvas de crescimento e de queda da glicose (Figura 54a) e a velocidade específica apresentou a maior queda (Figura 55b). Tudo isso ocorreu sob condições constantes de pH e de temperatura, indicando que o principal fator limitante foi o oxigênio. Para reforçar esta afirmação, observou-se que essas mudanças coincidiram com o momento em que o OD atingiu a concentração crítica teórica de 60 % da saturação (Figura 50). Esses dados reforçam as recomendações de Rossi (2006) sobre a importância da transferência de oxigênio para o cultivo desses fungos a um baixo nível de agitação.

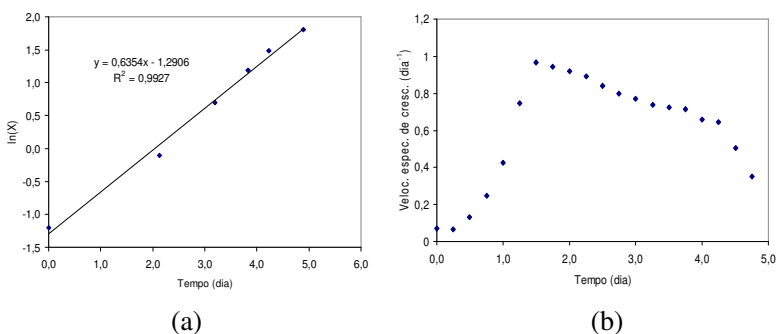


Figura 55. Determinação da velocidade específica média de crescimento (a) e perfil da velocidade específica de crescimento (b), durante o cultivo controlado do isolado UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*) em biorreator *airlift*.

A Figura 56 compara a forma dos *pellets* de biomassa obtidos neste estudo com a forma dos *pellets* obtidos por Rossi (2006). Pode-se perceber que os *pellets* do trabalho de Rossi (2006) tinham formato mais esférico do que os *pellets* do presente estudo. Isso é devido ao fato de as

tensões cisalhantes terem variado muito no cultivo atual, em função das oscilações da vazão de ar, ao passo que no trabalho de Rossi (2006), a vazão foi mantida constante do início ao final do cultivo. As oscilações na vazão são decorrentes do estágio atual de entendimento da lógica de desenvolvimento do controlador BRF.vi). Essa limitação será eliminada com o uso mais prolongado do sistema à luz das informações aqui obtidas.

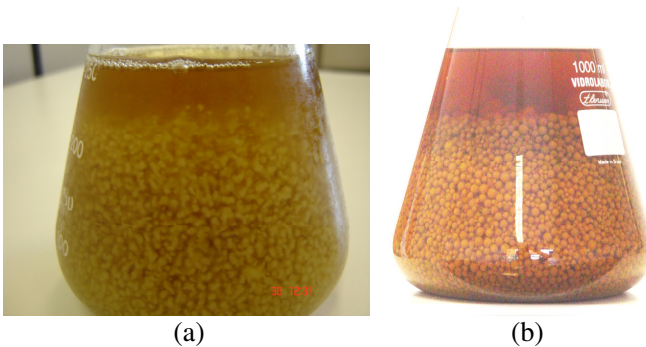


Figura 56. Aspecto da biomassa obtida em dois diferentes cultivos do isolado UFSC-Rh90 (*Rhizopogon nigrescens*) em biorreator *airlift*, comparando a morfologia dos *pellets* obtidos neste trabalho (a), e no trabalho de Rossi (2006) (b).

É importante ressaltar que os eventos observados durante este cultivo controlado foram muito oportunos, pois contribuíram para um melhor entendimento do sistema. Os dados deverão, ainda, ser analisados por um profissional da área de controle para que possam servir como elementos para o aperfeiçoamento da estratégia do controlador BRF.vi.

6. Considerações finais

A utilização de carvão ativo em meio sólido tem se mostrado a única estratégia para a manutenção da viabilidade dos isolados de fECM estudados em suspensões micelianas. Mas é necessário que se busquem alternativas, pois o carvão, embora adsorva os metabólitos tóxicos, pode, também, adsorver os nutrientes do meio de cultura e restringir o crescimento. Isso é particularmente importante para alguns fungos, como os isolados UFSC-Sc42 e UFSC-Rh90.

A adição de ácido ascórbico, embora diminua a oxidação da suspensão miceliana do isolado UFSC-Pt116, não melhora a viabilidade do micélio nessas suspensões. Somente o carvão ativo permite a manutenção da viabilidade por longos períodos de tempo (7 dias). O processo de auto-inibição parece não estar correlacionado a fenômenos de oxidação.

A ausência de oxigênio, através da injeção de nitrogênio na suspensão miceliana, inibe a auto-oxidação dos ácidos graxos do isolado UFSC-Pt188 após fragmentação, porém não impede a perda de viabilidade.

Quanto aos aspectos relacionados ao pH do meio de cultivo, pode-se concluir que todos os tampões testados apresentaram boa capacidade de tamponamento durante o cultivo dos fECM UFSC-Sc42 e UFSC-Pt188. Conclui-se, também, que o aumento da biomassa desses fungos durante seu cultivo é acompanhado pelo decréscimo de pH do meio de cultura. Além disso, o fECM UFSC-Pt188 promove uma maior acidificação do meio que o fECM UFSC-Sc42.

Os isolados UFSC-Rh90, UFSC-Sc42 e UFSC-Pt188 apresentam maior produção de biomassa quando cultivados em meio líquido em frascos estáticos sem carvão ativo. Já o isolado UFSC-Pt116 apresenta maior valor de biomassa quando cultivado em meio com carvão. Assim, conclui-se que a utilização de carvão ativo no meio de cultura líquido para a maioria dos isolados não propicia aumento de biomassa. Essa prática é importante somente para a manutenção da viabilidade e não para obtenção de aumento da biomassa.

Os isolados UFSC-Rh90 e UFSC-Sc42 não apresentam formação de metabólitos inibidores não voláteis.

O filtrado fúngico do isolado UFSC-Pt188 não inibe o crescimento do próprio fungo por confrontação direta, mas o filtrado do isolado UFSC-Rh90 apresenta potencial de inibição em relação ao fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, tanto em meio com carvão ativo quanto

em meio sem carvão. Já o filtrado do isolado fECM UFSC-Pt188 apresenta capacidade de inibição do fitopatógeno, somente em meio sem carvão ativo. A antibiose provocada por esses isolados parece não estar relacionada à produção de ácidos orgânicos nem à acidificação do meio de cultura.

Os filtrados de cultura dos isolados de fECM UFSC-Rh90 e UFSC-Sc 42 não inibem os microrganismos *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (ATCC25922).

Os metabólitos resultantes da fração de acetato de etila apresentam propriedades inibitórias ao fungo produtor, independentemente da presença ou não do carvão ativo. Os metabólitos intracelulares, resultantes da fração aquosa do fECM UFSC-Sc42, não apresentam propriedades inibitórias frente ao próprio fungo produtor, nem em relação ao fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, em meio sólido, mas apresentam ação inibidora frente à bactéria *Staphylococcus aureus*.

Os resultados obtidos das frações extra e intracelular dos isolados UFSC-Rh90 e UFSC-Pt188, por meio de cromatografia em camada delgada e cromatografia gasosa, mostram uma maior quantidade de compostos presentes na porção extracelular. A análise de espectroscopia de infravermelho dessas frações, revelou a presença de alcoóis e fenóis. Outras absorções de forte ocorrência, conjuntamente com a observação de bandas largas de OH, indicam presença de ácidos e ésteres graxos. A presença de carboidratos foi evidenciada tanto na fração intracelular como na extracelular.

A formação dos metabólitos tóxicos nas suspensões micelianas está fortemente associada à fragmentação do micélio. Isso prejudica o cultivo, seja para inoculação em biorreator, seja para produção do inoculante. Tais metabólitos parecem ser de origem intracelular e são liberados durante a ruptura das hifas, gerando uma condição desfavorável à viabilidade do fungo. Tal constatação não exclui o fato de esses mesmos metabólitos serem liberados durante o crescimento do fungo em meio líquido. Neste caso, porém, a quantidade liberada seria menor ou as substâncias liberadas menos prejudiciais ao crescimento do fungo.

O cultivo controlado (vazão, pH, temperatura e oxigênio dissolvido) em biorreator *airlift* do isolado UFSC-Rh90 permitiu a obtenção de 6,1 g.L⁻¹ de biomassa com 41 % de conversão do substrato (glicose) em células. A velocidade específica média de crescimento desse isolado obtida para as condições de cultivo estipuladas foi de 0,63 dia⁻¹. Enfrentaram-se problemas como falta de energia elétrica e paradas inexplicáveis do sistema, mas tais problemas foram oportunos e irão contribuir para um melhor entendimento do sistema.

7. Referências Bibliográficas

- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. New York: John Wiley & Sons, 869p., 1996.
- ALVES, J. R.; SOUZA, O.; PODLECH, P. A. S.; GIACHINI, A. J.; OLIVEIRA, V. L. Efeito de inoculante ectomicorrízico produzido por fermentação semi-sólida no crescimento de *Eucalyptus dunnii* Maiden. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.2, p. 307-313, 2001.
- AMBIENTE BRASIL <http://www.ambientebrasil.com.br> (Consulta realizada em 04/2006)
- ANDRADE, A. C. S.; QUEIROZ, M. H.; HERMES, R. A. L.; OLIVEIRA V. L. Mycorrhizal status of some plants of the Araucaria forest and the Atlantic rainforest in Santa Catarina, Brazil. **Mycorrhiza**, v.10, n.3, p.131–136, 2000.
- ARORA, D.K.; ELANDER, R.P.; MUKERJI, K.G. **Handbook of applied mycology - Fungal Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, v. 4, 1114p., 1992.
- ASSOCIAÇÃO MINEIRA DE SILVICULTURA <http://www.showsite.com.br/silviminas/html/index.asp?Metodo=ExibirDet&Grupo=2%20&SubGrupo=13> (Consulta realizada em 04/2006).
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 299p., 1996.
- BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; PINTO, A. C.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.
- BONNARME, P.; DELATTRE, M.; DROUET, H.; CORRIEU, G.; ASTHER, M. Towards a control of lignin and manganese peroxidases hypersecretion by *Phanerochaete chrysosporium* in agitated vessels: evidence of the superiority of pneumatic bioreactors on mechanically agitated bioreactors. **Biotechnology and bioengineering**, v. 41, n. 4, p. 440-450, 1993.
- BRUNDRETT, M., BOUGHER, N., GROVE, T. E MALAJCZUK, N. **Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture**. ACIAR (Australian Centre for International Agriculture Research) Monograph 32, Canberra, 1996.

CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Estabelecimento de plantas herbáceas em solo com contaminação de metais pesados e inoculação de fungos ectomicorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 12, p. 1443-1452, 2001.

CASTRO, J. I. R.; DANELL, E.; PFEFFER, P. A C-NMR study of exsudation and storage of carbohydrates and amino acids in the ectomycorrhizal edible mushroom *Cantharellus cibarius*. **Mycologia**, v.94, n.2, p.190-199, 2002.

COSTA, M. D.; PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; BORGES, A. C. Ectomicorizas: a face oculta das florestas. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, ano. 5, n.29, p. 38-46, 2003.

COSTA, M. J. N.; CAMPOS, V. P. O.; PFENNING, L. H.; OLIVEIRA, D. F. Toxicidade de filtrados fúngicos a *Meloidogyne incognita*. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.4, p. 749-755, 2001.

DUARTE, F.S.; DUZZIONI, M.; MENDES, B.G.; PIZZOLATTI, M.G.; LIMA, T.C.M. Participation of dihydrostyryl-2-pyrones and styryl-2-pyrones in the central effects of *Polygala sabulosa* (Polygalaceae), a folk medicine topical anesthetic. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.86, n.1, p.150-161, 2007.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v.57, p.25-39, 1971.

DHAOUADI, H.; PONCIN, S.; HORNUT, J. M.; WILD, G. Solid effects on hydrodynamics and heat transfer in an external loop airlift reactor. **Chemical Engineering Science**, v.61, n.4, p. 1300-1311, 2006.

DI PIETRO, M.; CHURIN, J.-L.; GARBAYE, J. Differential ability of ectomycorrhizas to survive drying. **Mycorrhiza**, v. 17, n.6, p. 547-550. 2007.

DUCHESNE, L.C.; ELLIS, B.E.; PETERSON, R.L. Disease suppression by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*: contribution of oxalic acid. **Canadian Journal of Botany**, v. 67, n.9, p. 2726-2730, 1989.

DUCHESNE, L.C.; PETERSON, R.L.; ELLIS, B.E. Pine root exsudate stimulates the synthesis of antifungal compounds by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. **New Phytologist**, v.108, n. 4, p. 471-476, 1988.

- EMBRAPA FLORESTAS. **Sistemas de Produção**, 4 ISSN 16788281 Versão Eletrônica, 2003.
- FINLAY, R. D.; FROSTERGARD, A.; SONNERFELDT, A. M. Utilization of organic and inorganic nitrogen sources by ectomycorrhizal fungi in pure culture and in symbiosis with *Pinus contorta* Dougl. ex Loud. **New Phytologist**, v.120, n.1, p. 105-115, 1992.
- FRANK, B. On the root-symbiosis-depending nutrition through hypogeous fungi of certain trees. **Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft**, v. 3, p. 128-145, 1885 (em alemão).
- FOMINA, M. A.; ALEXANDER, I. J.; COLPAERT, J. V.; GADD, G. M. Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 851-866, 2005.
- FURTADO, A. A. L.; ALBUQUERQUE, R. T.; LEITE, S. G. F.; PEÇANHA, R. P. Effect of hydraulic retention time on nitrification in an airlift biological reactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.15, n.3, p. 303-307, 1998.
- GARBAYE, J. Utilisation des mycorhizes en sylviculture. In: STRULLU, D. G. (Ed.). **Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées**. Paris: Lavoisier. p. 197-250, 1990.
- GARBAYE, J. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, v. 128, n. 2, p. 197-210, 1994.
- GARBAYE, J.; CHURIN, J.L. Growth stimulation of young oak plantations inoculated with the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* with special reference to summer drought. **Forest Ecology and Management**, v.98, n.3, p. 221-228, 1997.
- GARRIDO, N.; BECERRA, C.; MARTICORENA, C.; OEHRENA, E., SILVA, M.; HORAK, E. Antibiotic properties of ectomycorrhizae and saprophytic fungi growing on *Pinus radiata* D. Don I. **Mycopatologia**, v.77, n.2, p.93-98, 1982.
- GIACHINI, A. J.; OLIVEIRA, V. L.; CASTELLANO, M. A.; TRAPPE, J. M. Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* plantations in southern Brazil. **Mycologia**, v.92, n.6, p. 1166-1177, 2000.
- GIACHINI, A. J.; SOUZA, L. A. B.; OLIVEIRA, V. L. Species richness and seasonal abundance of ectomycorrhizal fungi in plantations

of *Eucalyptus dunnii* and *Pinus taeda* in southern Brazil . **Mycorrhiza**, v.14, n.6, p. 375-381, 2004.

GOUVEIA, E. R.; HOKKA, C. O.; BADINO Jr., A. C. The effects of geometry and operational conditions on gás holdup, liquid circulation and mass transfer in an airlift reactor. **Brazilian Journal Chemical Engineering**, v.20, n.4, p. 363-374, 2003.

GRAVILESCU, M.; ROMAN, R. V. Performance of airlift bioreactors in the cultivation of some antibiotic producing microorganisms. **Acta Biotechnologica**, v.18, n.3, p. 201-229, 1998.

HARVEY, L. M. Cultivation techniques for the production of ectomycorrhizal fungi. **Biotechnology Advances**, v.9, n.1, p.13-29, 1991.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: Schmidell W., Lima U.A., Aquarone E., Borzani W. (eds). **Biotecnologia Industrial Vol II: Engenharia Bioquímica**, São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda., p. 93-122, 2001.

HOUGHTON, P. J.; RAMAN, A. Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts. Great Britain: Chapman & Hall, p. 113-114, 1998.

HUNG, L.; TRAPPE, J.M. Growth variation between and within species of ectomycorrhizal fungi in response to pH *in vitro*. **Mycologia**, v. 75, n.2, p. 234-241, 1983.

INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS, 2002.
Link: [http://www. Ipef.br](http://www.Ipef.br) Acesso em 07/10/2007:

JARGEAT, P.; GAY, G.; DEBAUD, J. C.; MARMEISSE, R. Transcription of a nitrate reductase from the symbiotic basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum* does not require induction by nitrate. **Molecular genetics and genomics**, v.263, n.6, p. 948-956, 2000.

JOHANN, S.; SILVA, D. L.; MARTINS, C. V. B.; ZANI, C. L.; PIZZOLATTI, M. G.; RESENDE, M. A. Inhibitory effect of extracts from Brazilian medicinal plants on the adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 2459-2464, 2008.

KASUYA, M. C. M.; TAHARA, S.; IGARASHI, T. Growth inhibition of pathogenic root fungi by extracts of ectomycorrhizal fungi or *Picea*

glehnii inoculated with ectomycorrhizal fungi. **Biotropia**, v.9, p. 53-61, 1996.

KOPE, H. H.; FORTIN, J. A. Inhibition of phytopathogenic fungi *in vitro* by cell free culture media of ectomycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.113, n.1, p. 57-63, 1989.

KOPE, H. H.; TSANTRIZOS, Y.S.; FORTIN, J. A.; OGEILVIE K.K. *p*-Hydroxybenzoilformic acid and (R)-(-)-*p*-hydroxymandelic acid, two antifungal compounds isolated from the liquid culture of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus arthizus*. **Canadian Journal of Botany**, v. 37, p., 258-264, 1991.

KUEK, C. Shake-flask culture of *Laccaria laccata*, an ectomycorrhizal basidiomycete. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.45, n.3 p.319-326, 1996.

LAPEYRIE, F.F.; BRUCHET, G. Some factors influencing viability of ectomycorrhizal fungal inoculum. **New Phytologist**, v.100, n. 4, p. 585-593, 1985.

LAPEYRIE, F.; RANGER, J.; VAIRELLES, D. Phosphate-solublizing activity of ectomycorrhizal fungi *in vitro*. **Canadian Journal of Botany**, v.69, p. 342-346, 1991.

MALVAREZ, G.; OLIVEIRA, V. L. A PCR/RFLP technique to characterize fungal species in *Eucalyptus grandis* Hill ex. Maiden ectomycorrhizas. **Mycorrhiza**, v.13, n.2, p. 101-105, 2003.

MARTIN, F.; CANET, D.; MARCHAL, J. P. *In vivo* natural-abundance C^{13} NMR studies of the carbohydrate storage in ectomycorrhizal fungi. **Physiologie Végétale**, v.22, n.6, p.733-743, 1984a.

MARTIN, F.; CANET, D.; MARCHAL, J.P.; BRONDEAU, J. *In vivo* natural abundance C^{13} nuclear magnetic resonance studies of living ectomycorrhizal fungi. Observation of fatty acids in *Cenococcum graniforme* and *Hebeloma crustuliniforme*. **Plant Physiology**, v.75, n.1, p. 151-153, 1984b.

MARTIN, F.; CÔTÉ, R.; CANET, D. NH_4^+ assimilation in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* (Maire) Orton, a N^{15} -NMR study. **New Phytologist**, v.128, n.3, p. 479-485, 1994.

MARTIN, F.; RAMSTEDT, M.; SÖDERHALL, K. Carbon and nitrogen metabolism in ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. **Biochimie**. v.69, n. 6-7, p. 569-581, 1987.

MARTIN, F.; STEWART, G. R.; GENETET, I.; MOUROT, B. The involvement of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in ammonia assimilation by the rapidly growing ectomycorrhizal ascomycete *Cenococcum geophilum* Fr. **New Phytologist**, v.110, n.4, p.541-550, 1988.

MARX, D. H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, v.59, n.2, p. 153-163, 1969.

MARX, D. H. Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections. **Annual Review of Phytopathology**. v.10, p.429-454, 1972.

MARX, D. H. The practical significance of ectomycorrhizae in forest establishment. In **Proceedings of The Marcus Wallenberg Foundation Symposia**. Estocolmo: The Marcus Wallenberg Foundation, p. 54-90, 1991.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p. 426- 428, 1959.

MOLINA, R.; TRAPPE, J. M. Applied aspects of ectomycorrhizae. **Advances in Agricultural Microbiology**. p. 305-324, 1982.

MONOD, J. **Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes**. Paris: Hermann; 1942.

MÜNZENBERGER, B.; HEILEMANN, J.; STRACK, D.; KOTKE, I.; OBERWINKLER, F. Phenolics of mycorrhizas and non-mycorrhizal roots of Norway spruce. **Planta**. v.182, p. 142-148, 1990.

NANDAN, R.; RAISUDDIN, S. Fungal regradation of industrial wastes and wastewater. In: ARORA, D. K.; ELANDER, R. P.; MUKERJI, K. G. **Fungal biotechnology**: Handbook of applied mycology, New York, p. 931-961, 1992.

NARLOCH, C. **Interação microrganismos solubilizadores de fosfatos-fungos ectomicorrízicos e o crescimento de *Pínus taeda* L.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 153p., 2002.

- OLIVEIRA, V. L.; SCHMIDT, V. D. B.; GOMES, N. C.; MAIA, D. C. Spécificité de champignons ectomycorhiziens vis-à-vis d'*Eucalyptus viminalis* Labill et *E. dunnii* Maiden. **Agronomie**, v.14, p. 57-62, 1994.
- OLIVEIRA, V. L.; SCHMIDT, V. D. B.; BELLEI, M. M. Patterns of arbuscular- and ecto- mycorrhizal colonization of *Eucalyptus dunnii* in southern Brazil. **Annals of Forest Sciences**, 54, p. 473-481, 1997.
- PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v.22, n.3, p. 189-259, 2004.
- PAULA, R. N. Ferramentas e estratégias melhoram eucalipto. **Revista da Madeira**. n.88, Ano 15, 2005.
 Sítio:http://www.remade.com.br/pt/revista_materia.php?edicao=88&id=704 Acesso em 14/10/2007.
- PETERSON, R. L.; MASSICOTTE, H. B.; MELVILLE, L. H. **Mycorrhizas: anatomy and cell biology**. Ottawa: National Research Council Press, 173 p., 2004.
- PIZZOLATTI, M. G. ; DUARTE, F. S ; LIMA, T. C. M.; MENDES, B. G. Anticonvulsant and anxiolytic-like effects of compounds isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in rodents: *in vitro* and *in vivo* interactions with benzodiazepine binding sites. **Psychopharmacology**, v. 197, n. 3, p. 351-360, 2008.
- POLZL, W. B. **Eficiência produtiva e econômica do segmento industrial da madeira compensada no Estado do Paraná**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Paraná, Curitiba, Brasil, 114p., 2002.
- RAMSTEDT, M.; MARTIN, F.; SÖDERHALL, K. Mannitol metabolism in the ectomycorrhizal basidiomycete *Piloderma croceum* during glucose utilization. A C-NMR study. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.28, n.1-4, p. 409-414, 1990.
- RASANAYAGAM, S.; JEFFRIES, P. Production of acid is responsible for antibiosis by some ectomycorrhizal fungi. **Mycological Research**, v. 96, n.11, p. 971-976, 1992.
- REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos**. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária UFPel, v.3, 321p, 2000.

RODRIGUES, L. S.; KASUYA, M. C. M.; BORGES, A. C. Viability of fragmented mycelia of ectomycorrhizal fungi entrapped in calcium alginate gels. **Mycorrhiza**, v.8, n.5, p. 263-266, 1999.

ROSSI, M. J. **Produção de inoculante de fungo ectomicorrízico utilizando fermentação no estado líquido em biorreator *airlift***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 93p., 2001.

ROSSI, M. J.; SOUZA, J. A. R.; OLIVEIRA, V. L. Inoculum production of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in an airlift bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.59, n.23, p. 175-181, 2002.

ROSSI, M. J.; PERCINOTTI, C. C.; FURIGO Jr., A.; OLIVEIRA, V. L. Produção de inoculante de fungos ectomicorrízicos em biorreator *airlift* para aplicação em viveiros florestais. In: **Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações** (CD-ROM), Florianópolis-SC, 2003.

ROSSI, M.J.; STREIT, H.C.; OLIVEIRA, V.L.; FURIGO Jr., A. Transferência e Consumo de Oxigênio durante o Cultivo de Fungo Ectomicorrízico em Biorreator Airlift com Circulação Externa: Determinação do kLa e da QO2. In: **XV Simpósio Nacional de Bioprocessos** (CD-ROM), Recife-PE, 2005.

ROSSI, M. J. **Tecnologia para produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos utilizando cultivo submerso em biorreator *airlift***. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 183 p., 2006.

ROSSI, M. J.; FURIGO Jr., A.; OLIVEIRA, V. L.. Inoculant production of ectomycorrhizal fungi by solid and submerged fermentations. **Food Technology and Biotechnology**, v. 45, n.3, p. 277-286, 2007.

SASEK, V.; MUSÍLEK, V. Cultivation and antibiotic activity of mycorrhizal basidiomycetes. **Folia Microbiologica**, v.12, n.6, p.515-523, 1967.

SELOSSE, M. A.; JACQUOT, D.; BOUCHARD, D.; MARTIN, F.; LE TACON, F. Temporal persistence and spatial distribution of an American inoculant strain of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* in a French forest plantation. **Molecular Ecology**, v.7, n.5, p.561-573, 1998.

SCHMIDELL, W. Agitação e aeração em biorreatores. In: Schmidell W., Lima U.A., Aquarone E., Borzani W. (eds). **Biotecnologia Industrial Vol II: Engenharia Bioquímica**, São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda., p. 277-231, 2001.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Tradução de AGUIAR, P. F.; ALENCASTRO, R. B., Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 460p., 2000.

SMÂNIA, A.; MONACHE, F. D.; SMÂNIA, E. F. A.; GIL, M. L.; BENCHETRIT, F. S. C. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr) Murr. **Journal Ethnopharmacology**, v.45, n.3, p.117-181, 1995.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. London/New York: Academic Press, 787p., 2008.

SOARES, B. G.; SOUZA, N. A.; PIRES, D. X. **Teoria e técnicas de preparação, purificação e identificação de compostos orgânicos**, Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 322p., 1988.

SOARES, C. H. L.; DURAN, N. Biodegradation of chlorolignin and lignin-like compounds contained in E1-pulp bleaching effluent by fungal treatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.95, n.2, p. 135-149, 2001.

SOARES, C. R. F. S.; ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. **Diagnóstico e reabilitação de área degradada pela contaminação por metais pesados**. In: V Simpósio Nacional sobre Recuperação de Áreas Degradadas, Belo Horizonte. p. 57-82, 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA. Fatos e números do Brasil florestal, 2006. Sítio: <http://www.sbs.org.br> Acesso em: 13/10/2007.

SOCRATES, G. **Infrared characteristic group frequencies**. Chichester: John Wiley & Sons, 249p., 1997.

SOUZA, L. A. B.; SILVA FILHO, G. N.; OLIVEIRA, V. L. Eficiência de fungos ectomicorrízicos na absorção de fósforo e na promoção do crescimento de eucalipto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.4, p.349-355, 2004.

SOUZA, L. A. B.; BONNASSIS, P. A. P.; SILVA, G. N. F.; OLIVEIRA, V. L. New isolates of ectomycorrhizal fungi and the growth of eucalypt. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 2, p. 235-241, 2008.

SUH, H. W.; CRAWFORD, R.; KORUS, R. A.; SHETTY, K. Production of antifungal metabolites by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* strain SMF. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 8, n.1, p. 29-36, 1991.

SUNDARI, S. K.; ADHOLEYA, A. Growth profile of ectomycorrhizal fungal mycelium: emphasis on substrate pH influence. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.83, n.3, p. 209-214, 2003.

SYLVIA, D.M.; SINCLAIR, W.A. Phenolic compounds and resistance to fungal pathogens induced in primary roots of Douglas fir by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. **Phytopathology**, v. 73, n.3, p. 390-397, 1983.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. **Journal Clinical Pathology**, v.22, n.2, p.158-161, 1969.

UTINO, S.; CARNEIRO, I.F.; CHAVES, L.J. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira prata (*Musa AAB*) *in vitro*. IV. Concentrações de sais de ácidos ascórbicos e frequência de subcultivos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, n.2, p. 409-412, 2001.

VIERECK, N.; HANSEN, P. E.; JAKOBSEN, I. Phosphate pool dynamics in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* studied by in vivo P-31 NMR spectroscopy. **New Phytologist**, v.162, n.3, p. 783-794, 2004.

VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do metaboloma – uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.9, n.36, p.58-69, 2006.

VOIGT, E.L.; OLIVEIRA, V.L.; RANDI, A.M. Mycorrhizal colonization and phenolic compounds accumulation on roots of *Eucalyptus dunnii* Maiden inoculated with ectomycorrhizal fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.9, p. 1905-1910, 2000.

WANG, Y.; MCNEIL, B. Production of the fungal exopolysaccharide scleroglucan by cultivation of *Sclerotium glucanicum* in an airlift reactor

with an external loop. **Journal of chemical technology and biotechnology**, v.63, n.3, p. 215-222, 1995.

WILCOX, H. E. Mycorrhizal Associations. In: NAKAS, J. P.; HAGEDORN, C. (Eds). **Biotechnology of Plant-Microbe Interactions**. New York: McGraw-Hill, p. 227-255, 1990.

YAMAJI, K.; ISHIMOTO H.; USUI, N.; NORI, S. Organic acids and water-soluble phenolics produced by *Paxillus* sp. 60/92 together show antifungal activity against *Pythium vexans* under acidic culture conditions. **Mycorrhiza**, v.15, n.1, p. 17-23, 2005.

YANG, R. D.; HUMPHREY, A. E. Dynamics and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures. **Biotechnology Bioengineering**, v.17, n.8, p.1211-1235, 1975.

YU-PING, S.; UNESTAM, T.; LUCAS, D.S.; JOHANSON, K.J.; KENNE, L.; FINLAY, R. Exudation-reabsorption in a mycorrhizal fungus, the dynamic interface for interaction with soil and soil organisms. **Mycorrhiza**, v.9, n.3, p.137-144, 1999.

ZHENG, Y. G.; CHEN, X. L.; WANG, Z. Microbial biomass production from rice straw hydrolysate in airlift bioreactors. **Journal of Biotechnology**, v.118, n.4, p. 413-420, 2005.

ZHU, H.; DANK, B. P.; HIGGINBOTHAM, K. O. Regulation of extracellular proteinase production in an ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme*. **Mycologia**, v.86, n.2, p. 227-234, 1994.

Anexos

Anexo 1. Efeitos estimados das variáveis do planejamento fatorial e seus respectivos níveis de significância (p) sobre a resposta biomassa para os isolados UFSC-Sc42 (*Scleroderma* sp.) e UFSC-Pt188 (*Pisolithus microcarpus*).

Fator	efeitos		p	
	UFSC-Sc42	UFSC-Pt188	UFSC-Sc42	UFSC-Pt188
(1) Citrato (L)	-0,99	0,73	0,199	0,013
Citrato (Q)	1,66	0,12	0,159	0,105
(2) Succinato (L)	-0,36	-0,96	0,460	0,009
Succinato (Q)	0,59	0,88	0,398	0,014
1 por 2	-1,46	-0,66	0,191	0,020

Legenda: (L) = Linear; (Q) = Quadrático.

Anexo 2. Efeitos principais das variáveis succinato de sódio e citrato de sódio na resposta variação de pH para os isolados UFSC-Sc42 e UFSC-Pt188.

Fator	efeitos		p	
	UFSC-Sc42	UFSC-Pt188	UFSC-Sc42	UFSC-Pt188
(1) Citrato (L)	0,14	0,17	0,374	0,013
Citrato (Q)	0,07	0,17	0,676	0,105
(2) Succinato (L)	-0,27	-0,60	0,214	0,009
Succinato (Q)	-0,03	0,52	0,850	0,014
1 por 2	-0,15	-0,32	0,465	0,021

Legenda: (L) = Linear; (Q) = Quadrático.

Anexo 3. Análise de variância para a resposta diâmetro da colônia dos isolados UFSC-Sc42 e UFSC-Rh90 para o experimento de produção de metabólitos inibidores não voláteis.

Efeitos	SQ	G L	MQ	F	p
Isolado	10,48	1	10,48	34,870	0,000001
Meio	4,24	1	4,24	14,110	0,000690
Etapas	2,93	1	2,93	9,750	0,003794
Isolado x Meio	0,11	1	0,11	0,360	0,553749
Isolado x Etapas	0,00	1	0,00	0,001	0,971465
Meio x Etapas	0,02	1	0,02	0,08	0,780366
Isolado x Meio x Etapas	2,06	1	2,06	6,85	0,013420
Erro	9,62	32	0,30		

SQ = Soma Quadrática; GL = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática.

Anexo 4. Análise de variância para a resposta diâmetro da colônia do fungo ectomicorrízico *Pisolithus microcarpus*, isolado UFSC-Pt188, quando cultivado em meio de cultura sólido contendo seu próprio filtrado fúngico nas concentrações de 0, 5, 10 e 15%.

Efeitos	SQ	GL	MQ	F	p
Concentração de Filtrado	40,89	3	13,63	1,97	0,1594942
Meio (com ou sem carvão)	578,79	1	578,79	83,57	0,0000001
Concentração x meio	18,44	3	6,15	0,88	0,4685475
Erro	110,81	16	6,93		

SQ = Soma Quadrática; GL = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática.

Anexo 5. Análise de variância para a resposta diâmetro da colônia em testes de inibição utilizando a fração intracelular de acetato de etila do fungo ectomicorrízico *Scleroderma* sp. (UFSC-Sc-42).

Efeitos	SQ	GL	MQ	F	p
Fração	3,2033	1	3,2033	34,55	0,000371
Adição de carvão	0,1633	1	0,1633	1,76	0,221028
Fração x Carvão	0,0033	1	0,0033	0,04	0,854331
Erro	0,7417	8	0,0927		

SQ = Soma Quadrática; GL = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática.

Anexo 6. Curva padrão de fenóis utilizada na determinação de compostos fenólicos do filtrado de cultura do fECM *Scleroderma* sp. (UFSC-Sc42).

